



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Vitor Hugo Migues

**Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise
multivariada no controle de qualidade de plantas
medicinais e fitoterápicos**

Salvador, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Área de concentração: Química Orgânica

Vitor Hugo Migues

**Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise
multivariada no controle de qualidade de plantas
medicinais e fitoterápicos**

Tese apresentada à Universidade Federal da Bahia
como parte dos requisitos para a obtenção do grau
de doutor em química, área de concentração:
química orgânica.

Orientador: Dra. Juceni Pereira de Lima David

Co-orientador: Dr. Jorge Mauricio David

Salvador, 2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Migues, Vitor Hugo
Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise
multivariada no controle de qualidade de plantas
medicinais e fitoterápicos. / Vitor Hugo Migues. --
Salvador, 2018.
446 f. : il

Orientadora: Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima
David.

Coorientadora: Prof. Dr. Jorge Maurício David.
Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em
Química) -- Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2018.

1. Schinus terebinthifolius. 2. Rhamnus purshiana.
3. Cassia angustifolia. 4. Plantago ovata. 5. Glycine
max. I. David, Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima.
II. David, Prof. Dr. Jorge Maurício . III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

VITOR HUGO MIGUES

“Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise multivariada no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Juceni Pereira de Lima David Juceni Pereira de Lima David
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Maurício David Jorge Mauricio David
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale Ademir Evangelista do Vale
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Valéria Belli Riatto Valéria Belli Riatto
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Érika Maria de Oliveira Ribeiro Érika Maria de Oliveira Ribeiro
Doutorado Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 17 de outubro de 2018.

Dedicatória

Para as pessoas, que, quando olho pra trás, sinto muitas saudades.

Para aquelas que me acolheram quando me senti sozinho.

Para aquelas que não sabem como foram importantes para mim.

Para as pessoas que me ajudaram a crescer e amadurecer.

Para as pessoas que sonharam e lutaram comigo.

Para aquelas que se alegram com as minhas vitórias.

Para todas as pessoas que fizeram diferença em minha vida.

À minha família,

meu alicerce.

Ofereço.

Agradecimentos

Sempre achei essa a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor p que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Nesses quatro anos de doutorado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais este sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras sinceras, um pouquinho da importância que elas tiveram, e ainda têm, nesta conquista e a minha sincera gratidão a todas elas

Primeiramente gostaria de agradecer a CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual esse trabalho não poderia ser realizado e ao Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ pela oportunidade oferecida. Agradeço, em especial, aos integrantes da secretaria do PPGQ, Michel, Luciana e Cristiane, que sempre estavam dispostos a ajudarem com a parte burocrática de documentos e faziam tais tarefas com a mesma prontidão como se fossem suas solicitações. A vocês meu muito obrigado.

Certamente não poderia ter feito a minha pesquisa se não fossem as pessoas que comigo estiveram por todo esse tempo. Tempo não só do doutorado, mas da minha vida. Estou em dívida com um grande número de pessoas sem os quais esta tese permaneceria apenas uma ideia. Acima de tudo, Prof. Juceni e Prof. Ademir, por estarem tão envolvidos e me apoiarem a tal ponto que eu sinto que este trabalho é tanto deles quanto meu; apesar de todos os erros e opiniões serem produtos da minha teimosia.

Tudo começou quando a Professora Juceni me aceitou como aluno de doutorado, um desconhecido que entrou em contato pela simples cara de pau que é, e desde então, ela tem sido conselheira, professora, colega e amiga e exemplo de profissional. A Professora Juceni levou este projeto como seu próprio desde o início e tenho a certeza que tudo que eu sempre precisei estava lá para ajudar, mesmo a distância por algum tempo, a partir de aulas às lições sobre a vida. Por isso, deixo aqui minha profunda admiração.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador, prof. Dr. Jorge Mauricio David, por me ter dado a oportunidade de trabalhar com tanta autonomia e liberdade no projeto, o que foi muito importante para minha maturidade como pesquisador.

Eu tive a sorte de interagir com muitos amigos e colegas que fizeram esta experiência muito mais do que apenas um curso de doutorado. Em especial aos colegas do laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN): Gildeon, José Fernando (Jota), Juliana, Everton, Evandro que tornaram a convivência muito mais prazerosa e imprescindível para o andamento deste projeto. A Ravir, Gauber, Angélica, Marla, agregados do LPPN pela amizade. Além disso, agradeço a todos os colegas de doutorado que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento profissional, seja nas discussões em sala de aula ou nos corredores da Universidade.

O crescimento profissional e intelectual só é possível graças à determinação, estudos e discussões. E isso não seria possível sem a ajuda de excelentes professores do Programa de Pós-Graduação em Química que compartilharam seus conhecimentos, vivências e experiências para que nos tornássemos grandes profissionais, o meu muito obrigado!!!

Finalmente, agradeço a minha família e aos amigos que tem sido imprescindíveis durante este longo processo. Aos meus pais, Antonio e Sonia. A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade; que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e com muitas esperanças; que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Amo vocês de uma forma que não consigo traduzir em palavras.

A Ana Rosa, minha “irmã” agregada, que sempre me incentivou e acreditou em mim mesmo quando eu duvidava.

Aos meus alunos, pelo respeito, confiança, compreensão e paciência pelos últimos dias em que não estive tão presente como deveria e como eles merecem.

E agradeço à Leandro Cabral que sempre estava pronto a me ajudar e me apoiar em que necessitasse, aturando meu mau humor na reta final de concretização deste sonho com “paciência”. Não há forma de expressar o sentimento de gratidão que sinto por você.

*Se eu pudesse deixar algum presente a você,
Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo que foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável.
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo a resposta
e a força para encontrar a saída”.*

Mahatma Gandhi

Nunca subestime as informações sobre plantas medicinais oriundas do saber popular, porém não as repasse de volta ao povo sem saber, cientificamente, se a atividade atribuída à planta realmente existe e se seu grau de toxicidade não irá submeter o usuário a riscos desnecessários”

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos

Resumo

Pesquisas científicas têm apontado a presença de diversas irregularidades nos produtos fitoterápicos e adulteração de drogas vegetais que comprometem a eficácia e colocam em risco a saúde do consumidor. Uma das causas para esse panorama tem sido o fato de as indústrias responsáveis pela fabricação desses produtos serem basicamente constituídas por empresas de pequeno porte que funcionam precariamente e que as pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são escassas, comprometendo a fiscalização do comércio por parte dos órgãos competentes. Visto que a má qualidade de um produto pode interferir na ação farmacológica preconizada para a espécie, potencializando efeitos indesejáveis, e que muitas plantas medicinais nativas sofrem ameaças que podem levá-las à extinção, pesquisas avaliando a qualidade de produtos a base de plantas medicinais e estabelecendo prioridades de conservação para espécies vegetais medicinais são essenciais. Dessa forma, o intuito deste projeto foi desenvolver metodologia por CLAE, através análise de compostos fenólicos, para obtenção de *fingerprint* do material vegetal comercializado *in natura* bem como fitoterápicos, tais como *Rhamnus purshiana* (cáscara-sagrada), *Schinus terebinthifolius* (aroeira), *Glycine max* (isoflavona de soja), *Plantago ovata Forssk* (plantago) e *Cassia angustifolia* (sene), no estado da Bahia. As análises por CLAE evidenciaram a importância da técnica para a determinação da impressão digital de cada vegetal. Além disso, pode-se evidenciar que algumas espécies, como aroeira e cáscara sagrada, apresentam picos divergentes quando comparadas ao material vegetal padrão. Por outro lado, a soja comercializada no estado da Bahia apresenta concentrações diversas dos mais diversos metabólicos. Tais dados é de suma importância para avaliar a segurança do produto vegetal consumido pela população. Além disso, o uso da técnica quimiométrica associada a outras análises, foi ímpar para avaliar a eficácia da metodologia e verificar a combinação ou discrepância das amostras. Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a metodologia atendeu os parâmetros de validação exigidos na Resolução RE nº 899, de maio de 2003, da ANVISA. Os coeficientes de correlação das análises de regressão linear foram próximos a 1. O método apresentou boa repetibilidade e recuperação satisfatória, além de seletivo e robusto.

Palavras-chave: *Rhamnus purshiana*, *Schinus terebinthifolius*, *Glycine max*, *Plantago ovata Forssk*, *Cassia angustifolia*.

Abstract

Scientific research has pointed out the presence of various irregularities in herbal products and adulteration of herbal drugs that compromise efficacy and endanger the consumer health. One of the causes for this scenario has been the fact that the industries responsible for the manufacture of these products are basically small businesses that work precariously and the research to evaluate the safe use of herbal and phytotherapeutic plants in Brazil is still scarce, compromising the supervision of trade by the appropriate agencies. Since the poor quality of a product can interfere with the pharmacological action recommended for the species, potentiating undesirable effects, and many native medicinal plants suffer threats that can lead to extinction, research evaluating the quality of herbal products and establishing priorities of conservation for medicinal plant species are essential. Thus, the aim of this project is to develop a methodology by HPLC, through the analysis of phenolic compounds, to obtain a fingerprint of the vegetal material marketed *in natura* and as phytotherapeutics such as *Rhamnus purshiana* (sacred shell), *Schinus terebinthifolius* (aroeira), *Glycine max* (soy isoflavone), *Plantago ovata* Forssk (plantago) and *Cassia angustifolia* (sene), at the state of Bahia. The analyzes by HPLC shows the technique importance for the fingerprint determination of each vegetable. In addition, it can be evidenced that some species, such as aroeira and sacred shell, present divergent peaks when compared with the standard vegetal material. On the other hand, the soybean marketed in the state of Bahia presents diverse concentrations of the most diverse metabolic. Such data is extremely important to evaluate the safety of the herbal product consumed by the population. In addition, the use of the chemometric technique associated with other analyzes was used to evaluate the effectiveness of the methodology and to verify the combination or discrepancy of the samples. Thus, the obtained results in this work demonstrates that the methodology satisfies the validation parameters required by ANVISA Resolution RE 899, May, 2003. The correlation coefficients of the linear regression analyzes were close to 1. The method presented good repeatability and satisfactory recovery, besides being selective and robust.

Key words: *Rhamnus purshiana*, *Schinus terebinthifolius*, *Glycine max*, *Plantago ovata* Forssk, *Cassia angustifolia*.

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Plantas Medicinais.....	20
1.2 Panorama mundial e nacional do uso das plantas medicinais	21
1.3 Biopirataria	23
1.4 Estrutura regulatória nacional sobre as plantas medicinais e fitoterápicos	24
1.4.1. Principais legislações nos últimos 10 anos.....	24
1.4.2. Pontos e definições importantes da RDC nº 18, de 03 abril de 2013 em relação ao controle de qualidade da matéria prima	24
1.4.3 Pontos e definições importantes da RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 em relação ao controle de qualidade da matéria prima	27
1.4.4 Pontos e definições importantes do Decreto nº 8077, de 14 de agosto de 2013	29
1.5 Caracterização (“<i>fingerprint</i>”) química.....	30
1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	31
1.5.1.1 – Parâmetros Cromatográficos (CASS, 2001; SNYDER e DOLAN, 1996) 33	
1.5.1.1.1 – Fator de Retenção (K)	33
1.5.1.1.2 – Fator de Separação (α)	33
1.5.1.1.3 – Número de Pratos (N).....	33
1.5.1.1.4 – Altura Equivalente a um Prato (H)	34
1.5.1.1.5 – Resolução (Rs).....	34
1.5.2 Otimização da separação (SNYDER e DOLAN, 1996; HOSTETTMANN <i>et al.</i>, 1984; CASS, 2001)	35
1.5.3 Técnicas cromatográficas combinadas	38
1.6 Modos de Separação.....	38
1.7 Extração em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction)	39
1.7.1 Etapas da Extração.....	40
1.8 Análise multivariada	41
1.8.1 Análise Exploratória dos Dados	42
1.8.2 Análise dos Componentes Principais (PCA)	44
1.8.3 Análise Hierárquica de Agrupamentos – HCA	45
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	55

3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
4. METODOLOGIA.....	57
4.1 Material botânico.....	57
4.2 Coleta de material fitoterápico	58
4.3 Padrões Químicos	58
4.3.1 Padrões utilizados para <i>S. terebinthifolius</i>	58
4.3.2 Padrões utilizados para <i>R. purshiana</i>	58
4.3.3 Padrões utilizados para <i>G. max</i>	58
4.3.4 Padrões utilizados para <i>P. ovata</i>	58
4.3.5 Padrões utilizados para <i>C. angustifolia</i>	59
4.4. Equipamento HPLC	59
4.4.1 Condições cromatográficas <i>S. terebinthifolius</i>	59
4.4.2 Condições cromatográficas <i>R. purshiana</i>	60
4.4.3 Condições cromatográficas <i>G. max</i>	61
4.4.4 Condições cromatográficas <i>P. ovata</i>	62
4.4.5 Condições cromatográficas <i>C. angustifolia</i>	63
4.5 Preparação dos extratos.....	64
4.6 Preparo das amostras.....	64
4.7 Preparo dos marcadores químicos.....	64
4.8 Validação	64
4.8.1 Especificidade	65
4.8.2 Linearidade	65
4.8.3 Precisão e exatidão.....	65
4.8.4 Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de detecção (LOD)	65
4.8.5 Robustez	66
4.8.6 Estabilidade.....	66
4.8.7 Validação através da técnica ultravioleta visível.....	66
4.8.8 Validação através de LC-MS.....	67
4.9 Análise Estatística.....	67
5. AROEIRA	69
5.1 <i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI	69
5.1.1 Características gerais	69

5.1.2 Aspectos etnobotânicos	72
5.1.3 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos	74
5.2 Resultados e Discussão	81
5.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.	81
5.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório.....	81
5.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores.....	84
5.2.2 Validação do método analítico desenvolvido.....	87
5.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico	87
5.2.2.2 Adição dos marcadores	90
5.2.2.3 Robustez	93
5.2.2.4 Linearidade e intervalo	95
5.2.2.4.1 Linearidade do ácido gálico	95
5.2.2.4.2 Linearidade da Catequina	97
5.2.2.4.3 Linearidade do Ácido Clorogênico	98
5.2.2.4.4 Linearidade da Epicatequina	99
5.2.2.4.5 Linearidade da Quercetina	101
5.2.2.4.6 Linearidade da Rutina	102
5.2.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	104
5.2.2.6 Precisão.....	105
5.2.2.6.1 Repetibilidade	106
5.2.2.6.2 Precisão intermediária	106
5.2.2.7 Exatidão.....	109
5.2.3 Desenvolvimento de marcadores de identidade.....	110
5.2.4 Espectrofotometria UV-VIS	111
5.2.5 Aplicação da metodologia proposta.	116
5.2.6 Análises Estatísticas.....	121
5.2.6.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)	122
5.2.6.2 Análise de plotagem de radar	126
5.2.6.3 Análise dos componentes principais (PCA)	127
5.2.6.3.1 Análise de PC1 x PC2.....	129
5.2.6.3.2 Análise de PCA tridimensional	131
5.2.7 Avaliação da metodologia	132
6. <i>Glycine max</i> L. (isoflavona de soja)	138

6.1 A soja	138
6.1.2 Classificação da soja	140
6.1.3 Estrutura e composição dos grãos de soja	140
6.1.4 As isoflavonas de soja	144
6.2 Resultados e Discussão	150
6.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.	150
6.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório	150
6.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores	152
6.2.2 Validação do método analítico desenvolvido	154
6.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico	154
6.2.2.2 Adição dos marcadores	156
6.2.2.3 Robustez	158
6.2.2.4 Linearidade	160
6.2.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação	165
6.2.2.6 Precisão	167
6.2.2.6.1 Repetibilidade	167
6.2.2.6.2 Precisão intermediária	168
6.2.2.7 Exatidão	171
6.2.3 Espectrofotometria UV-VIS	173
6.2.4 Aplicação da metodologia proposta.	178
6.2.5 Análises Estatísticas	183
6.2.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)	184
6.2.5.2 Análise de plotagem de radar	185
6.2.5.3 Análise de dos componentes principais (PCA)	187
6.2.5.3.1 Análise de PC1 x PC2	189
6.2.5.3.2 Análise de PC1 X PC3	191
6.2.5.3.2 Análise de PCA tridimensional	192
6.2.6 Avaliação da metodologia	193
7. <i>Rhamnus purshiana</i> – Cáscara Sagrada	200
7.1. Família Rhamnaceae	200
7.1.1 Aspectos Botânicos	200
7.1.1.1 Descrição da espécie <i>Rhamnus purshiana</i>.	201
7.1.2 Aspectos farmacológicos e químicos	203

7.1.2.1 Compostos antraquinônicos	205
7.2 Resultados e Discussão	211
7.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.	212
7.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório.....	212
7.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores.....	214
7.2.2 Validação do método analítico desenvolvido.....	215
7.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico	215
7.2.2.3 Robustez	220
7.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	222
7.2.2.5 Precisão.....	223
7.2.2.5.1 Repetibilidade	223
7.2.2.5.2 Precisão intermediária	224
7.2.2.6 Exatidão.....	226
7.2.3 Espectrofotometria UV-VIS	227
7.2.4 Aplicação da metodologia proposta.	229
7.2.5 Análises estatísticas	232
7.2.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)	233
7.2.5.2 Análise de plotagem de radar	234
7.2.5.3 Análise dos componentes principais (PCA)	235
7.2.5.3.1 Análise de PC1 x PC2.....	237
7.2.5.3.2 Análise de PCA tridimensional	238
7.2.6 Avaliação da metodologia	239
8 SENE - <i>Cassia angustifolia</i>	245
8. 1 Aspectos botânicos e farmacognósticos do Sene (<i>Cassia angustifolia</i>).....	245
8.2 Extratos secos de Sene.....	251
8.3 Análise química dos derivados de Sene	253
8.4 Resultados e Discussão	261
8.4.1 Análise de senosídeos.....	261
8.4.2 Espectro de UV para os marcadores	263
8.4.3 Validação do método analítico desenvolvido.....	264
8.4.3.1 Avaliação da seletividade do método analítico	265
8.4.3.2 Adição dos marcadores	266
8.4.3.3 Robustez	267

8.4.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	268
8.4.3.5 Precisão.....	269
8.4.3.5.1 Repetibilidade	269
8.4.3.5.2 Precisão intermediária	270
8.4.3.5.3 Exatidão.....	271
8.4.3.5.4 Linearidade e intervalo de confiança.....	272
8.4.4 Aplicação da metodologia proposta.	275
8.4.5 Espectrofotometria UV-VIS	278
8.4.6 Análises estatísticas	283
8.4.6.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)	283
8.4.6.2 Análise de dos componentes principais (PCA)	284
8.4.6.2.1 Análise de PC1 x PC2.....	285
8.4.7 Avaliação da metodologia	287
9. <i>Plantago ovata</i> (plantago).....	291
9.1 A Família Plantaginaceae	291
9.2 Farmacologia do gênero <i>Plantago</i> e de seus constituintes fitoquímicos	291
9.2.1 <i>Plantago ovata</i> Forssk.	297
9.2.2 Prospecção Fitoquímica de <i>Plantago ovata</i> Forssk.....	299
9.3 Teste de identificação de acordo com compêndios nacionais e internacionais	303
9.4 Resultados e Discussão.	304
9.4.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.	305
9.4.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório.....	305
9.4.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada composto.	308
9.4.2 Validação do método analítico desenvolvido.....	310
9.4.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico	310
9.4.2.1.1 Adição dos marcadores	311
9.4.2.1.2 Seletividade	313
9.4.2.2 Robustez	314
9.4.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	316
9.4.2.4 Precisão.....	317
9.4.2.4.1 Repetibilidade	318
9.4.2.4.2 Precisão intermediária	318
8.4.2.5.3 Exatidão.....	321

9.4.2.5 Linearidade e intervalo de confiança.....	323
9.4.3 Aplicação da metodologia proposta.....	326
9.4.4 Espectrofotometria UV-VIS	329
9.4.5 Análises estatísticas	332
9.4.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)	332
9.4.5.2 Análise de dos componentes principais (PCA)	333
9.4.5.2.1 Análise de PC1 x PC2.....	334
9.4.5.2.2 Análise de PCA tridimensional	336
9.4.6 Avaliação da metodologia	337
10. Conclusão e Perspectiva Futura.....	340
11. REFERÊNCIAS	343
12. Apêndice	386
12.1 Apêndice A	386



Fonte: <http://saude.abril.com.br/bem-estar/conheca-e-saiba-usar-37-plantas-medicinais/>

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

O uso de espécies vegetais para tratamento de doenças e sintomas é uma prática milenar de grande parte da população como recurso terapêutico (STASI, 1996). Praticamente todos os povos ou etnias usam plantas medicinais e seus derivados de forma direta ou indireta para tratar males que acometem o homem e/ou para atingir o bem-estar físico, mental e social (KOROLKOVAS, 1996). Essa forma de medicina tradicional é particularmente comum nas nações em desenvolvimento, onde a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% das pessoas dependam da fitoterapia (FARNSWORTH, 1997). De acordo com Cañigüeral *et al.* (2003), cerca de 50% das plantas são usadas na alimentação, 25% em cosméticos, 20% pela indústria farmacêutica e 5% em outras atividades, sendo estimado em 10.000 o número de espécies vegetais medicinais. No Brasil, além das plantas medicinais serem comercializadas em feiras livres e mercados públicos, elas têm sido cada vez mais usadas como componentes de produtos industrializados comercializados em farmácias, casas de produtos naturais e supermercados, como drogas vegetais e/ou fitoterápicos (FARIAS *et al.*, 2012). O Brasil é o país de maior biodiversidade em plantas medicinais do mundo. Entretanto, apenas em 2006, foram publicadas políticas governamentais voltadas para o setor, como a Política Nacional de Plantas Medicinais (PNPM). Essas políticas ocasionam diversas mudanças, dentre outras ações, a elaboração/ adequação do marco regulatório e incentivo à pesquisa para plantas medicinais, priorizando a biodiversidade do país o desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva (BRASIL, 2006; SCHULZ *et al.*, 2002).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF) incentiva a pesquisa com plantas exóticas adaptadas ou nativas, incluídas na Relação Nacional de Fitoterápicos (RENAFITO), subsidiada por estudos e pesquisas em desenvolvimento e inovação de produtos principalmente no setor agroindustrial (BRASIL, 2009). Os critérios, para inclusão na RENAFITO, são: i) ser uma espécie da flora brasileira não ameaçada de extinção; ii) ter distribuição por diversos biomas brasileiros; iii) possuir evidências de segurança e eficácia; iv) registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); v) ser fitoterápicos de uso na atenção básica e vi) ser produzido com plantas exóticas adaptadas ou nativas (BRASIL, 2006; 2009).

O Decreto nº 6041, de 08 de fevereiro de 2007, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia no País, apresenta como diretriz o estímulo à geração de produtos agropecuários estratégicos visando novos patamares de competitividade e a segurança alimentar, mediante a diferenciação de produtos que viabilizem a conquista de novos mercados, tendo como alvos, dentre eles, a pesquisa de insumos bioativos, priorizando a biodiversidade do país, com potencial eficiência no controle de microrganismos (BRASIL, 2007).

1.2 Panorama mundial e nacional do uso das plantas medicinais

A utilização de plantas buscando o restabelecimento da saúde vem sendo utilizada ao longo dos séculos por diversas culturas, fundindo hoje os conhecimentos populares das mais variadas origens e agregando novas descobertas científicas (RATES, 2001; OKIGBO *et al.*, 2008). Como planta medicinal entende-se uma espécie vegetal cultivada ou não, utilizada em sua totalidade ou suas partes, com propósitos terapêuticos (OMS, 2003).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial, principalmente a dos países em desenvolvimento, utiliza a chamada ‘medicina tradicional’ para suprir as suas necessidades médicas primárias. Com base nestes dados, a OMS instituiu em 1977 um programa de incentivo ao estudo das plantas medicinais. Além disso, das 252 drogas consideradas básicas por esta organização, 11% são de origem vegetal (RATES, 2001).

As plantas medicinais respondem por cerca de 25% do total das prescrições médicas em países industrializados; nos países em desenvolvimento a participação de plantas medicinais no arsenal terapêutico alcança 80%. Enquanto pesquisas realizadas no Brasil demonstram que 91,9 % da população já fez uso de alguma planta medicinal, sendo que 46 % da população mantém um cultivo caseiro de plantas medicinais (MARQUES e PETROVICK, 2007).

Utilizadas como matéria-prima para produção de extratos ou para o isolamento de substâncias naturais puras, representam uma área em franca expansão. Adquirem importância cada vez maior as substâncias naturais puras e os extratos purificados ou padronizados, que permitem melhor caracterização analítica e preenchem melhor os requisitos de qualidade, eficácia e segurança, exigidos de qualquer medicamento moderno, seja ele natural ou sintético (LEITE e SCHOR, 2005).

Afirma-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal é estimado em US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50% deste mercado (PAUSEY, 1986 apud PEREIRADA-SILVA, 2007). Outras estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas de plantas (ROBBERS *et al.*, 1996). No Brasil, quanto ao mercado de fitoterápicos, estima-se que ele gire em torno de 1 bilhão de reais / ano.

Mesmo assim, apenas três países da América Latina (Argentina, Brasil e México) possuem farmacopéias oficiais atualizadas ou em processo de atualização. Nas farmacopéias oficiais, a grande maioria das monografias corresponde a fármacos sintéticos. As monografias de plantas medicinais constituem minoria e são, principalmente, de plantas de origem européia. A IV edição da Farmacopéia Brasileira contém 41 monografias de plantas medicinais, das quais, apenas algumas são de plantas brasileiras. A falta de especificações para determinar a autenticidade, a pureza e qualidade do material vegetal é um dos fatores limitantes para isto (GILBERT *et al.*, 2005).

Na América Latina, o Brasil, em particular, a indústria de fármacos, baseada em plantas medicinais, é incipiente e pouco desenvolvida. Um diagnóstico determinou que os produtos à base de plantas medicinais produzidos na América Latina apresentam, em geral, baixa qualidade. Contribuem para isso a dificuldade de obter plantas medicinais em quantidade e em qualidade desejadas, à falta de conhecimentos tecnológicos e o desconhecimento ou a inexistência de processos de controle de qualidade (GILBERT *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2009).

O estudo da variabilidade genética de plantas medicinais é de muita importância, tanto em nível da variabilidade interespecífica, quanto em nível da variabilidade intraespecífica. Entretanto, em nível intraespecífico essas diferenças ainda não estão suficientemente estudadas. Atualmente, a preocupação com a perda da variabilidade e a extinção de espécies com potencial medicinal têm gerado demanda por trabalhos de coleta, preservação e estudo sobre tais plantas. Portanto para conservação e manejo eficiente destas espécies medicinais, a composição genética dos acessos coletados em diferentes regiões deve ser avaliada (CARVALHO *et al.*, 2009).

Um exemplo é a comercialização da ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), cujo uso farmacológico está ligado à presença de dois alcaloides em suas raízes (a emetina e a cefalina) que conferem à planta o poder emético e amebicida. O Brasil é o principal exportador, seguido do Panamá e Costa Rica, para laboratórios de países, tais como:

Estados Unidos, Inglaterra e Canadá (mercado estimado em 5 milhões de dólares). Devido ao intenso processo extrativo nos dois séculos passados e, também, por ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas, atualmente é uma espécie ameaçada de erosão genética ou em vias de extinção. Porém, sendo uma espécie passível de ser adequar a um sistema de cultivo economicamente viável, ela pode ser um modelo para estudo de sistemas aproveitáveis da biodiversidade em áreas florestais que estão sob alta pressão econômica (LAMEIRA, 2002).

1.3 Biopirataria

Outro grande problema que concerne as plantas medicinais é a biopirataria. Conforme Galdino (2012) não existe uma definição clara para a biopirataria, mas o termo está associado a empresas e instituições de pesquisas que exploram ilegalmente plantas e animais e os conhecimentos de comunidades tradicionais. A partir daí elas elaboram novos produtos e passam a deter, por meio de patentes toda a renda da comercialização. Desde 2003, o Comitê de Gestão do Patrimônio Genético, discute um projeto de lei definitivo sobre o assunto. A idéia é estabelecer regras para beneficiar as comunidades com o uso comercial de seus conhecimentos e definir a biopirataria como crime. Existe, também, a necessidade de regular a questão internacionalmente, visto que muitos países, especialmente os desenvolvidos, não reconhecem o direito das nações sobre o patrimônio genético nativo, o que, na prática, incentiva suas empresas a continuarem com a biopirataria.

Plantas como o cumaru ou erva tonca (6,700 kg) no ano de 1991 foram objeto de grande exportação para a Alemanha, e o pau-de-rosa (*Aniba rosaeodora*) (37,079 Kg) para a Europa e os Estados Unidos. O guaraná (*Paullinia* sp.), a ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), o ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), a casca-sagrada (*Rhamnus purshiana*), o boldo (*Peumus boldus*), a copaíba (*Copaifera multijuga*) também estão no rol das inúmeras ervas exportadas (SILVA *et al.*, 2005).

Um exemplo ilustrativo de biopirataria em nosso país é o que ocorre com o chá de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), o qual, nas comunidades tradicionais, é utilizado para fins diuréticos e problemas renais. Esta planta foi processada sinteticamente por um laboratório norte-americano, revendida para o Brasil na forma de remédio industrializado e consumido pelos próprios brasileiros, sem que o país ou a população fossem beneficiados financeiramente (SILVA *et al.*, 2005).

1.4 Estrutura regulatória nacional sobre as plantas medicinais e fitoterápicos

1.4.1. Principais legislações nos últimos 10 anos

Com relação aos produtos industrializados, encontram-se registrados na ANVISA, 432 fitoterápicos simples e 80 compostos. O setor produtivo industrial possui uma legislação ampla (Quadro 1) no tocante aos aspectos da produção e comercialização de fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2008).

1.4.2. Pontos e definições importantes da RDC nº 18, de 03 abril de 2013 em relação ao controle de qualidade da matéria prima

A RDC nº 18 (03/04/2013) determina os requisitos mínimos exigidos para o exercício das atividades de preparação de plantas medicinais e fitoterápicos em *farmácias vivas*, visando à garantia de sua qualidade, segurança, efetividade e promoção do seu uso seguro e racional. Para os efeitos desta Resolução, consideram-se farmácias vivas aquelas instituídas pela Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010, do Ministério da Saúde, que instituiu a farmácia viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), e que realizam as etapas de cultivo, coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos (Art. 1º). As disposições desta Resolução aplicam-se somente aos estabelecimentos que realizam as atividades de preparação de plantas medicinais e fitoterápicos oriundos de horta ou horto oficial ou comunitário a serem dispensados no âmbito do SUS, não sendo permitida sua comercialização. Caso necessário, as matérias-primas de origem vegetal poderão ser adquiridas de fornecedores qualificados (Art. 2º).

Quadro 01: Regulamentação federal criada pela ANVISA para o controle da qualidade dos medicamentos fitoterápicos industrializados e insumos farmacêuticos

<i>Ato</i>	<i>Conteúdo</i>
RDC nº 140/2003	Estabelece regras de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde.
RDC nº 210/2003	Aprova as Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos.
RDC nº 48/2004	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
RE nº 88/2004	Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de Fitoterápicos".
RE nº 90/2004	Determina a publicação da "Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade pré-clínica de Fitoterápicos".
RE nº 91/2004	Determina a publicação da "Guia para realização de alterações, inclusões, Notificações e cancelamentos pós registro de Fitoterápicos".
RDC nº 249/2005	Estabelece o regulamento técnico das boas práticas de fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos.
CP nº 98/2005	Propõe o regulamento técnico sobre produtos derivados de droga vegetal.
RDC nº 204/2006	Determina a todos os estabelecimentos que exerçam as atividades de importar, exportar, distribuir, expedir, armazenar, fracionar e embalar insumos farmacêuticos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico de Boas Práticas de Distribuição e Fracionamento de Insumos Farmacêuticos.
RDC nº 67/2007	Magistrais.
RDC nº 95/2008	Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos
IN nº 05/2008	Determina a publicação da "Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado".
RDC nº 04/2009	Dispõe sobre as normas de farmacovigilância para os detentores de registro de medicamentos de uso humano.
CP nº 63 de 2009	Insumos.
Portaria MS 886 de 2010	Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal.
RDC nº 10/2010	Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais.

RDC nº 14/2010	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
RDC nº 17/2010	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
CP nº 85 de 2010	Proposta de Resolução que dispõe sobre as Boas Práticas de Processamento e Manipulação de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Farmácias Vivas.
RDC nº 18, de 03 abril de 2013	Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).
Decreto nº 8077, de 14 agosto de 2013	Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências.
RDC nº 26, de 13 maio de 2014	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos
IN nº 2, de 13 maio de 2014	Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”

Cada lote da matéria-prima deve ser acompanhado do respectivo Certificado de Análise do fornecedor, que deve permanecer arquivado, no mínimo, durante 6 (seis) meses após o término do prazo de validade do último produto preparado. No caso de matéria-prima obtida de horta/horto oficial ou comunitário, não é necessária a apresentação de certificado de análise, cabendo apenas a qualificação do fornecedor (Art. 89). Para fins de controle, deve ser realizada a montagem da coleção de amostras das espécies trabalhadas (exsicatas), que servirão como padrão, contendo a parte utilizada seca e inteira, acondicionada em embalagem apropriada (Art. 108).

As matérias-primas devem ser analisadas, no seu recebimento, efetuando-se no mínimo os testes abaixo, quando aplicáveis, respeitando-se as suas características físicas e mantendo os resultados por escrito: caracteres organolépticos; solubilidade; pH; peso; volume; ponto de fusão; densidade; e avaliação do laudo de análise do fabricante/fornecedor, exceto para matéria-prima obtida de horta/horto oficial ou

comunitário (Art. 109). Devem ser realizados nas matérias-primas de origem vegetal os seguintes testes e avaliações: testes para determinação de materiais estranhos e adulterantes, pesquisas de contaminação microbiológica (contagem total, fungos e leveduras), umidade e determinação de cinzas totais, prospecção fitoquímica ou perfil cromatográfico, e índice de acidez (quando aplicável); avaliação dos caracteres macroscópicos para plantas íntegras ou grosseiramente rasuradas; e avaliação dos caracteres microscópicos para materiais fragmentados ou pó.

Para as matérias-primas líquidas de origem vegetal, além dos testes mencionados no "*caput*" deste artigo, quando aplicável, deve ser realizada a determinação da densidade (Art. 110). É facultado à farmácia viva terceirizar o controle de qualidade de preparações manipuladas do estoque mínimo, com laboratórios tecnicamente capacitados para este fim (Art. 142).

A determinação do prazo de validade das preparações deve ser baseada na sua avaliação físico-química e microbiológica, quando aplicável. Deve ser estabelecido um procedimento operacional para a determinação do prazo de validade dos produtos acabados. Não havendo estudos conclusivos para a validade dos produtos, deverá ser estabelecido um prazo máximo de validade de 3 (três) meses. Fontes de informações sobre a estabilidade físico-química dos fitoterápicos devem incluir referências de compêndios oficiais, recomendações dos produtores e publicações em revistas indexadas. Na interpretação das informações sobre estabilidade dos produtos, devem ser consideradas todas as condições de armazenamento e conservação (Art. 158).

1.4.3 Pontos e definições importantes da RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 em relação ao controle de qualidade da matéria prima

A Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 (13/05/2014) tem em sua redação a resolução que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Esta Resolução define as categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico e estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamento fitoterápico, e para o registro, renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (Art. 1).

Esta Resolução se aplica aos produtos que se enquadram nas categorias de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos. São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas

vegetais, cuja segurança e eficácia seja baseada em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja segurança e efetividade seja baseada na tradicionalidade de uso e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Os produtos tradicionais fitoterápicos são utilizados exclusivamente no uso interno ou externo para o alívio sintomático de doenças de baixa gravidade, não podendo se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, e não podendo conter matérias-primas de risco tóxico conhecido. Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Os medicamentos fitoterápicos são passíveis de registro, enquanto os produtos tradicionais fitoterápicos são passíveis de registro ou notificação. São considerados produtos tradicionais fitoterápicos passíveis de notificação os descritos na última edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB) e que possuam monografia específica de controle de qualidade publicada em farmacopeias reconhecidas pela Anvisa. Os medicamentos à base de derivados de fungos multicelulares e algas deverão ser avaliados conforme esta Resolução até que tenham regulamentação específica. As preparações extemporâneas notificadas não podem conter excipientes em suas formulações, sendo constituídas apenas de drogas vegetais. As preparações caseiras manipuladas pelas comunidades e povos tradicionais do país, de utilização e distribuição gratuita para a comunidade local, não são objeto de registro ou notificação sanitária (Art. 2).

Para efeito desta Resolução, são adotadas as seguintes definições (Art. 3º):

I) Controle biológico: método alternativo à análise quantitativa do(s) marcador(es) da matéria-prima vegetal e produto acabado, baseado na avaliação da atividade biológica proposta para o fitocomplexo.

II) Decocção: preparação que consiste na ebulição da droga vegetal em água potável por tempo determinado, método indicado para partes de drogas vegetais com consistência rígida, tais como cascas, raízes, rizomas, caules, sementes e folhas coriáceas, ou que contenham substâncias de interesse com baixa solubilidade em água.

III) Fitocomplexo: substâncias, originadas no metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados; folheto informativo: cartilha que acompanha os produtos

tradicionais fitoterápicos contendo informações de composição e uso do produto para instruir o consumidor final.

IV) Infusão: preparação que consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por um período determinado, método indicado para partes de drogas vegetais de consistência menos rígida, tais como folhas, flores, inflorescências e frutos, ou com substâncias ativas voláteis, ou ainda, com boa solubilidade em água.

V) Marcador: substância ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, o marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo.

VI) Perfil cromatográfico: padrão cromatográfico de constituintes característicos, obtido em condições definidas, que possibilite a identificação da espécie vegetal em estudo e a diferenciação de outras espécies.

VII) Preparação extemporânea: aquela para uso imediato pelo consumidor final na forma de infuso, decocto ou macerado, obtido da droga vegetal, sem adição de excipientes, e notificada conforme o FFFB.

VIII) Prospecção fitoquímica: testes de triagem, qualitativos ou semiquantitativos, que utilizam reagentes de detecção específicos para evidenciar a presença de grupos funcionais característicos na matéria-prima vegetal e que auxiliam na identificação da espécie vegetal e na diferenciação de outras espécies.

IX) Uso tradicional: aquele alicerçado no longo histórico de utilização e de experiência dos conhecimentos, saberes e práticas de comunidades e povos tradicionais e locais, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário.

1.4.4 Pontos e definições importantes do Decreto nº 8077, de 14 de agosto de 2013

O Decreto nº 8077 (14/agosto/2013) define que as plantas medicinais sob a forma de droga vegetal serão dispensadas de registro, conforme critérios estabelecidos em regulamentação específica pela Anvisa. O reconhecimento da efetividade das drogas vegetais poderá ser realizado com base no uso tradicional, a partir de experiências existentes no País e no exterior (Art. 22).

1.5 Caracterização (“*fingerprint*”) química

As plantas medicinais contêm mais de um princípio ativo, em quantidades variáveis, mas sempre pequenas, e grande quantidade de material secundário que pode afetar significativamente a ação farmacológica, a tecnologia da extração e a formulação farmacêutica (TYLER *apud* BALICK *et al.*, 1996).

Adicionalmente, os medicamentos fitoterápicos apresentam diferenças importantes quando comparados com os sintéticos. A primeira, é que ao contrário dos medicamentos sintéticos, os princípios ativos dos fitoterápicos raramente são conhecidos. Outra diferença fundamental é que o controle de qualidade e a padronização dos fitoterápicos são tarefas bem mais complexas do que no caso dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2001).

Quando a análise morfológica não é possível de ser realizada ou impossibilita a identificação das espécies vegetais, pode-se utilizar marcadores moleculares característicos (*fingerprints*) para este objetivo. O estabelecimento de um *fingerprint* característico, geralmente cromatográfico, e sua utilização para identificação de uma espécie ou variedade vegetal é consistente, independente do tecido e da idade da planta (SHAW e BUT, 1995).

Assim, a análise química através do *fingerprint* constitui uma maneira racional e estratégica para assegurar a autenticidade, consistente qualidade e estabilidade das plantas medicinais e suas preparações. Na China, por exemplo, o uso dos *fingerprints* já tem se constituído em importante ferramenta para o monitoramento da qualidade nas preparações fitoterápicas da Medicina Chinesa tradicional (XIE *et al.*, 2006).

Gao *et al.* (2012) usando a técnica de CLAE-UV (detector com arranjo de fotodiodos) desenvolveu e validou metodologia cromatográfica baseada no *fingerprint* que possibilitou a identificação e a quantificação do princípio ativo (gentiopicrin) em 20 ervas de duas espécies botânicas (*Gentiana scabra* e *Gentiana rigescens*) cultivadas em diferentes localidades na China.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que se encontram em íntimo contato, a fase estacionária (f_e) e a fase móvel líquida (f_m). Na prática, a fase estacionária é o “suporte” contido no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente (ANDRADE *et al.*, 2006; USP 30, 2007).

Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, devido ao fato de terem maior ou menor afinidade com a fase móvel. O grau de migração é determinado pela magnitude das interações da fase estacionária e da amostra com a fase móvel (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

As separações por CLAE são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição em fase reversa (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

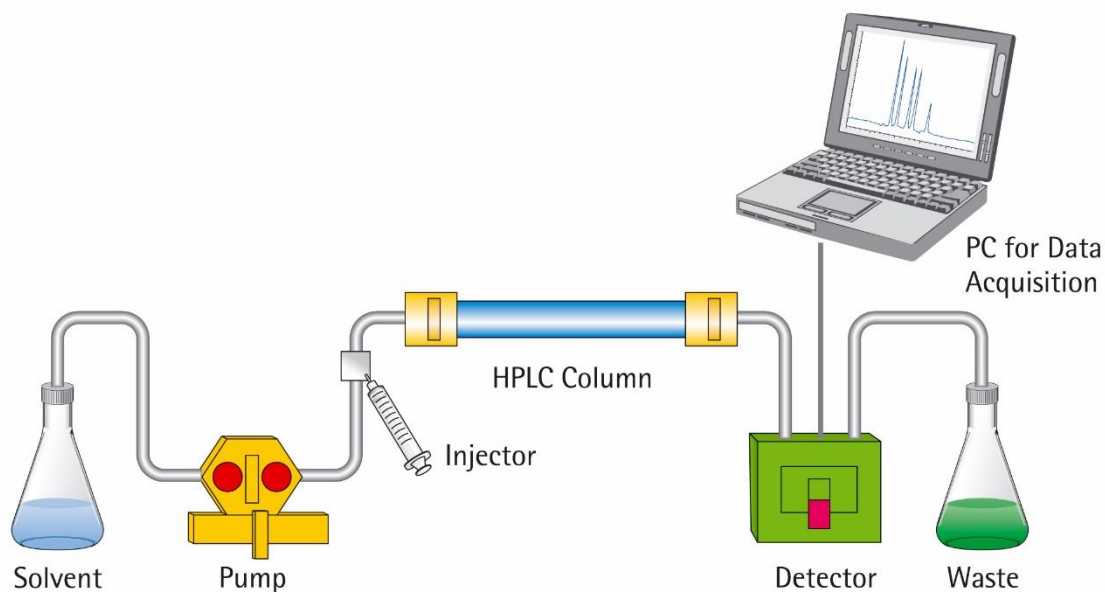
A exigência cada vez maior na obtenção de produtos de origem vegetal com qualidade requer o emprego de técnicas seletivas e eficientes, que possibilitem com segurança a identificação e quantificação de diferentes classes de compostos, o que pode ser obtido com a utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (MEYER, 2005).

Esta técnica tem sido usada de maneira rotineira para análise e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas, como extratos de plantas, obtendo-se cromatogramas que são usados como “impressão digital” ou “*fingerprint*”, fornecendo informações importantes quanto ao tipo de constituintes presentes (GOMES, 2009).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI *et al.*, 2009).

A CLAE é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante o desenvolvimento cromatográfico, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, resultando em migrações diferenciais destes componentes (McMaster, 1994).

A representação esquemática de um equipamento de CLAE (Figura 1) é composto por um reservatório de solvente, uma bomba de alta pressão, injetor da amostra, coluna cromatográfica, detector e registrador de dados, que são divididos em módulos, que podem ser controlados individualmente ou por computador (CASS e DEGANI, 2001).



Fonte: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytcs/hplc-analysis>

Figura 1: Componentes básicos de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A bomba de alta pressão empregada em CLAE tem a função de enviar um fluxo constante e reprodutível de fase móvel para a coluna e apresenta características totalmente especiais. As principais são: devem operar a pressões de 0,01 a 35 MPa (0,1 a 350 bar), com a mesma precisão e exatidão de operações a pressão quase ambiente; intervalo de vazões entre 0,01 e 5 mL/min para aplicações analíticas, entre 0,05 e 200 μ L/min para uso com colunas microbore e capilar, e até 100 mL/min para aplicações preparativas. Repetitividade e constância da vazão de 1%. Elas não devem ser corroídas pelas fases móveis empregadas. A bomba deve proporcionar ao sistema uma vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (CIOLA, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

Os detectores mais empregados em CLAE são os espectrofotômetros no UV/VIS. Eles determinam a diferença de absorvância na região do ultravioleta ou no visível, sendo, assim, um detector seletivo para moléculas que possuem cromóforos. Os detectores por arranjo de fotodiodos fornecem espectros de varredura do analito no UV-VIS e tem sido utilizado há mais de uma década para o estudo da química de plantas, o qual vem sendo muito empregado nos laboratórios de pesquisa (CASS, 2001; HOSTETTMANN *et al.*, 1984; YOSHIMURA *et al.*, 1994).

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para

preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (DEGANI *et al.*, 1998).

1.5.1.1 – Parâmetros Cromatográficos (CASS, 2001; SNYDER e DOLAN, 1996)

1.5.1.1.1 – Fator de Retenção (K)

O fator de retenção, K, é uma medida de retenção de um soluto e ele é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel, como mostra a equação:

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

onde, t_R é o tempo de retenção e t_0 o tempo de retenção de um soluto não retido. Os valores ideais para K variam de 2,0 a 10,0. Valores menores que 2,0 indicam pouca interação entre o soluto e a fase estacionária, enquanto valores maiores que 10 indicam interação muito forte com a fase estacionária, resultando em análises demoradas.

1.5.1.1.2 – Fator de Separação (α)

Mede a seletividade da separação para duas bandas adjacentes. É calculado pela razão entre os fatores de separação do soluto mais retido (K_2) e do soluto menos retido (K_1), como mostra a equação. Pode ser alterado por variação na fase móvel e/ou estacionária, temperatura, pH e força iônica.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

1.5.1.1.3 – Número de Pratos (N)

Número de pratos, N, é parâmetro relacionado à eficiência cromatográfica. Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel.

Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação.

Na prática, o número de pratos é uma medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito passa através do sistema e pode ser calculado pela equação:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

onde, W_b é a largura de um pico na linha de base e $W_{0,5}$ é a largura do pico na meia altura.

Qualitativamente, a eficiência pode ser avaliada pelo formato do pico cromatográfico. Quanto mais estreito for o pico, maior a eficiência da coluna na separação do soluto a que o pico se refere.

1.5.1.1.4 – Altura Equivalente a um Prato (H)

É a correlação entre o número de pratos teóricos e o tamanho da coluna. É medido pela razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos, que pode ser calculado pela equação:

$$H = \frac{L}{N}$$

1.5.1.1.5 – Resolução (Rs)

É uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculado de acordo com a equação:

$$R_s = 2 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} = 1,77 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{0,05\ 1} + W_{0,05\ 2})}$$

onde, t_{R1} e t_{R2} = tempos de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na linha de base;

$W_{0,5\ 1}$ e $W_{0,5\ 2}$ = largura dos picos a meia-altura.

Valores de R_s acima de 1,5 são considerados ideais, indicando uma boa separação entre os picos.

1.5.2 Otimização da separação (SNYDER e DOLAN, 1996; HOSTETTMANN *et al.*, 1984; CASS, 2001)

A otimização de uma separação é feita alterando-se os parâmetros cromatográficos K , α e N , de acordo com equação básica da resolução:

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) (\alpha - 1)\sqrt{N} \frac{(K)}{(1 + K)}$$

O primeiro e mais fácil parâmetro a ser alterado é o fator de retenção (K), seguido pelo fator de separação (α). Em último caso, torna-se necessária a alteração no número de pratos teóricos (N).

A retenção de um componente é controlada pela força do solvente. Solventes fortes diminuem a retenção e solventes fracos aumentam a retenção. A força cromatográfica da fase móvel adequada para uma separação é selecionada através da análise do fator de retenção, K . Um valor de K baixo significa pouca interação dos solutos com a fase estacionária. Por outro lado, um valor de K elevado implica forte interação entre o soluto e a fase estacionária. Nenhum extremo é recomendado, seja por fornecerem separações pouco eficientes seja por implicarem tempos de análises longos, com alargamento dos picos. O intervalo ideal de fator de retenção é $1 \leq K \leq 10$; entretanto, para análises de múltiplos componentes, também se aceita $0,5 \leq K \leq 20$.

É importante ressaltar que, em separações de misturas complexas pelo modo isocrático, raramente serão obtidos valores ideais de K para todos os componentes da amostra, sendo recomendável o uso da eluição gradiente.

O fator de retenção no modo reverso pode ser aumentado pelo aumento do percentual de água e, conseqüentemente, diminuído pelo acréscimo do percentual do modificador orgânico. A troca de uma fase C_{18} por uma C_8 também pode ser feita para alterar o fator de retenção.

No modo normal de eluição, o aumento do fator de retenção é conseguido pelo aumento do percentual do solvente de maior polaridade. Fases estacionárias de diferentes polaridades também podem ser usadas para conseguir a desejada retenção. Após o ajuste

do fator de retenção, a seletividade da separação deve ajustada e para isso deve-se manter o K conseguido. Alteração em α são feitas levando-se em consideração as interações do soluto com o solvente, resultando de suas características, tanto no modo reverso quanto no modo normal.

Para determinar a melhor seletividade da fase móvel, pode ser empregado o método empírico do modelo dos quatro solventes. Apesar de haver inúmeros solventes passíveis de utilização como fase móvel, verificou-se que um número reduzido era escolhido, surgindo então o modelo dos quatro solventes, esquematizado na Figura 2. Esse procedimento está baseado no triângulo de seletividade. A seletividade em cromatografia no modo reverso pode ser alcançada variando-se três solventes de seletividades diferentes – metanol (MeOH), tetraidrofurano (THF) e acetonitrila (ACN) – e utilizando-se água para ajustar a força cromatográfica da mistura. Para separações por cromatografia no modo normal, utilizam-se éter metil terc-butílico (MTBE), clorofórmio (CHCl_3), ou cloreto de metileno (CH_2Cl_2) com hexano para ajuste da força cromatográfica.

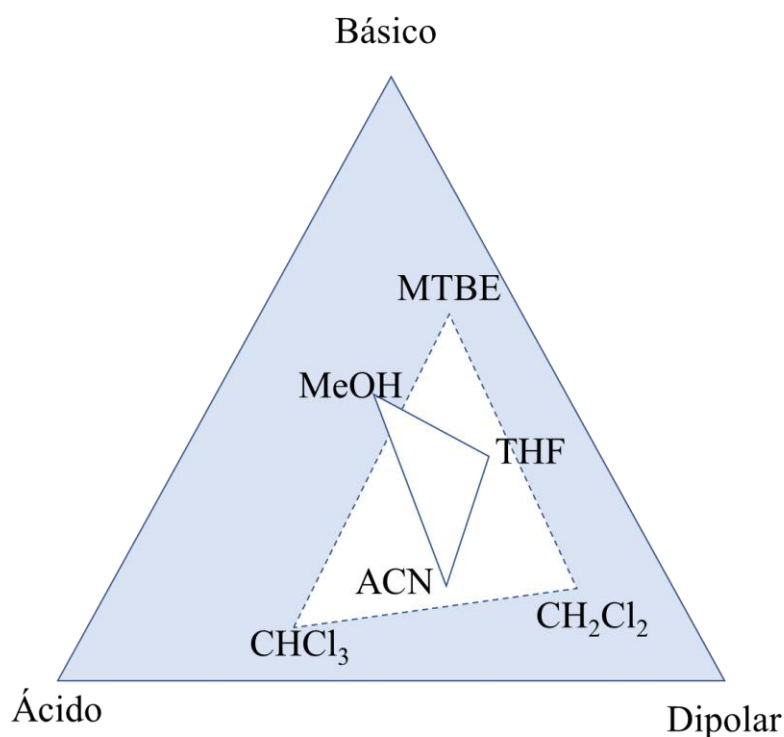


Figura 2: Triângulo de seletividade para os solventes preferidos em: - fase reversa, ---- fase normal.

Para manter a polaridade da mistura praticamente constante, na troca de solventes de diferentes seletividades, usa-se o nomógrafo mostrado na Figura 3 (SNYDER *et al.*, 2010).

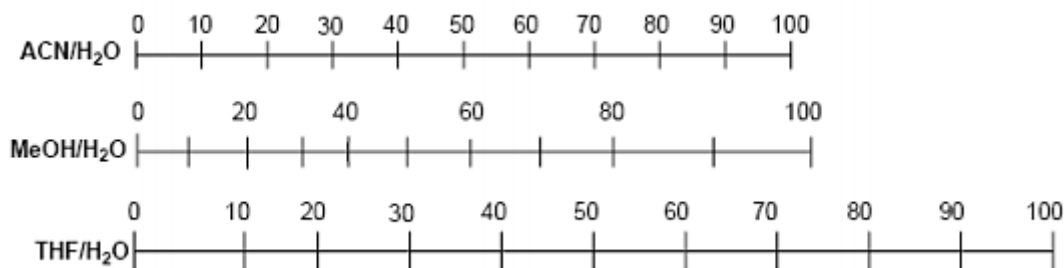


Figura 3: Nomógrafo no modo reverso

A acetonitrila (ACN) é a primeira alternativa para início dos testes de escolha da fase móvel. A mistura ACN/H₂O pode ser usada na detecção no UV, pois absorve a baixos comprimentos de onda (185-210 nm). A mistura possui também baixa viscosidade, resultando em maior número de pratos teóricos e em pressões mais baixas na coluna. O próximo melhor solvente orgânico a ser escolhido é o metanol (MeOH), seguido do tetraidrofurano (THF). O THF possui algumas desvantagens, tais como absorção em maior comprimento de onda no UV, forma peróxido na presença de oxigênio e gera um lento desequilíbrio da coluna quando a fase móvel é modificada, dificultando seu uso em eluição gradiente. A seletividade pode ainda ser alterada por troca da fase estacionária, levando-se em consideração as interações específicas, resultantes de cada tipo de fase: C₁₈, sílica, aminopropilsílica, ciano, fenil, diol etc. e/ou por interações com grupos silanóis residuais nas fases quimicamente derivadas (SNYDER *et al.*, 2010).

A otimização do número de pratos teóricos é feita considerando a equação:

$$N = \frac{L}{H}$$

Na equação o número de pratos teóricos (N) é diretamente proporcional ao tamanho da coluna (L) e inversamente proporcional à altura dos pratos teóricos (H). Conseqüentemente, mantendo-se os outros parâmetros constantes, um aumento de L resulta em um aumento de N, e quanto menor for H, maior será o valor de N. Os fatores que favorecem a obtenção de baixos valores de H são: utilização de colunas de partículas

pequenas, fluxos de fase móvel baixos, fases móveis pouco viscosas, altas temperaturas de separação e separação de pequenas concentrações de amostra.

1.5.3 Técnicas cromatográficas combinadas

Estudos dos processos de purificação, isolamento e caracterização estrutural das substâncias de origem vegetal têm permitido a possibilidade de estabelecer estratégias apropriadas para análise dos processos de padronização de preparações fitoterápicas de forma a manter suas homogeneidade e qualidade.

Técnicas analíticas como a cromatografia em camada fina (CCD), a cromatografia a gás (CG), a cromatografia a líquido (CLAE), a espectrometria de massa (EM), a espectrometria na região do infravermelho (IV), a espectrometria na região do ultravioleta/visível (UV/VIS), etc., ou, a combinação destas técnicas (CLAE/UV, CLAE/EM-EM, CG/EM-EM, etc.) tem sido usadas com sucesso na padronização e no controle de qualidade das plantas e de seus produtos (CALIXTO, 2000; MARSTON, 2007).

1.6 Modos de Separação

A classificação da cromatografia líquida de acordo com as modificações químicas realizadas na fase estacionária (sílica gel) levou a uma grande variedade de tipos. A separação em cromatografia líquida pode ser encontrada explorando a variedade de processos existentes, dos quais os mais importantes são: cromatografia no modo normal, no modo reverso, de compostos iônicos, de troca iônica, cromatografia de exclusão e cromatografia quiral. Neste trabalho foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo reverso.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo reverso constitui a modalidade cromatográfica na qual a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. Salienta-se ainda que tal processo é o mais utilizado nos laboratórios de pesquisas industriais e acadêmicas, além do seu amplo emprego em análises de rotina (OLSEN, 2001).

A grande utilização desta modalidade cromatográfica dá-se à existência de uma grande variedade de fases estacionárias disponíveis comercialmente, que permitem ao

usuário alcançar a seletividade desejada (LINGEMAN *et al.*, 1997). Ressalta-se ainda que a fase móvel é em grande parte composta por água, um solvente não tóxico e barato.

O princípio da retenção no modo reverso é a hidrofobia. A separação no modo reverso se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa (CASS e DEGANI, 2001)

Dentro da CLAE no modo reverso, a maioria das fases utilizadas atualmente são baseados em silanos C_8 ou C_{18} quimicamente ligados à superfície de sílica. Como fase móvel são utilizados solventes com caráter polar, geralmente uma mistura de água e solventes orgânicos miscíveis com a água (BOTTOLI *et al.*, 2002). A força da fase móvel na cromatografia no modo reverso depende do tipo de solvente orgânico escolhido (solvente B) e sua porcentagem em água (solvente A). Os solventes orgânicos comumente usados são: acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF) (SNYDER *et al.*, 1997).

1.7 Extração em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction)

A extração em fase sólida é uma técnica de extração que tem se popularizado devido ao fato de ser rápida, consumir menores volumes de solvente e de amostra e ser de fácil mecanização (HENNION, 1999). Atualmente é muito empregada, sendo utilizada, principalmente, no pré-tratamento de amostras para análise por CLAE e Cromatografia a Gás (CG) (QUEIROZ *et al.*, 2002).

A extração em fase sólida emprega sorventes empacotados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 μ m de tamanho de partícula, retidos no tubo através de dois filtros (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Os materiais de recheio são muito semelhantes às fases estacionárias das colunas utilizadas na CLAE, porém com tamanho de partícula maior. Esses materiais são, na sua maioria, à base de sílica modificada com grupos octadecil (C_{18}), octil (C_8), amino (NH_2), ciano (CN) ou à base de resinas poliméricas, carbono grafitizado e alumina (LINGEMAN e HOESTRA-OUSSOREN, 1997)

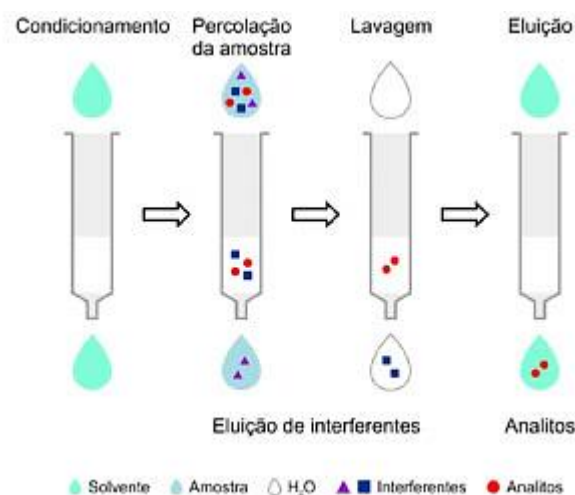
As características de fase sólida podem diferenciar, dependendo do fabricante, do suporte, do tamanho de partículas, do tamanho de poros e área superficial levando a uma imensa variedade de materiais disponíveis comercialmente (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Beltrame e colaboradores (2006) utilizaram a extração em fase sólida para obter um composto puro do extrato hidroalcoólico da Catuaba. Nesta pesquisa, a cinchonaína foi isolada pela passagem do extrato em um cartucho C₁₈, sendo em seguida usado como padrão externo para o desenvolvimento e validação de um método por CLAE-DAD para quantificação deste composto em amostras de Catuaba vendidas em todo o Brasil.

Em outro estudo, Genovese e Lajolo (2001) relataram a utilização da extração em fase sólida para a obtenção das isoflavonas, daidzeína e genisteína, em derivados protéicos de soja e alimentos industrializados.

1.7.1 Etapas da Extração

Existem quatro etapas básicas que devem ser seguidas em um procedimento de SPE, as quais são descritas abaixo (Figura 4) (HENNION, 1999; GENOVESE e LAJOLO, 2001; FRITZ e MACKA, 2000).



Fonte: CALDAS *et al.*, 2011

Figura 4: Esquema do procedimento de SPE; A) Condicionamento do cartucho; B) Percolação da amostra; C) Lavagem; D) Eluição.

1- Condicionamento: esta etapa tem o objetivo de preparar o leito do sorvente, previamente à extração, para permitir um contato efetivo da solução líquida da amostra,

geralmente polar, com a superfície do sorvente, geralmente apolar. Esta etapa envolve a passagem de um solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) através do sorvente e depois a remoção do solvente por um líquido de composição similar a amostra (água);

2- Percolação da amostra: nesta etapa a amostra é passada através do sorvente, que é responsável pela extração, com a ajuda de vácuo, no caso de seringas, cartuchos ou discos. A amostra pode, dependendo de sua interação com o sorvente, ser constituído de quatro tipos diferentes de substâncias: o primeiro tipo não tem nenhuma afinidade pelo sorvente e não interage com este; o segundo tem fraca interação com o sorvente e é arrastado na etapa de lavagem; o terceiro apresenta uma interação adequada com o sorvente e é eluído na etapa de eluição, o quarto apresenta uma afinidade muito grande pelo sorvente e permanece retido neste mesmo após a etapa de eluição;

3- Lavagem: o propósito da lavagem é permitir que algumas impurezas fracamente retidas sejam eliminadas pela passagem de um solvente fraco (água);

4- Eluição: na etapa de eluição as espécies de interesse são removidas do sorvente e retornam para a fase líquida. Normalmente emprega-se metanol ou acetonitrila.

1.8 Análise multivariada

Os métodos de análise de dados multivariados foram desenvolvidos por pesquisadores da área de psicometria. A gênese desse método remete ao século XIX, porém a sua crescente popularidade só se tornou possível com o advento do computador (WOLD *et al.*, 1987).

Somente a partir dos anos sessenta do século XX é que os métodos de análise de dados multivariados foram paulatinamente ganhando espaço nos diferentes campos de pesquisa que tradicionalmente não os usava, em uma razão que crescia em ritmo semelhante ao do desenvolvimento de máquinas de processamento de dados cada vez mais potentes (WOLD *et al.*, 1987).

Nesse panorama surgiu a quimiometria, que é considerada uma área da química destinada à análise de dados de natureza multivariada (QUEIROZ *et al.*, 2001, 2002). Embora a quimiometria seja uma área relativamente nova, ela já produz um impacto de tal modo que existem diversos *softwares* comerciais disponíveis para o processamento dos mais diversos métodos quimiométricos (HOPKE, 2003; GELADI, 2003).

O termo só apareceu na década de 1970, na química analítica, como decorrência dos progressos na instrumentação (que produz dados) e nos microcomputadores (que permitem processar esses dados) (NETO *et al.*, 2006).

A quimiometria pode ser definida como uma área da química que usa métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos e extrair o máximo da informação química relevante, com a análise de dados (BORGES, 2001).

Hoje em dia, muitos químicos passaram a ter como objetivo de estudo e pesquisa, o desenvolvimento e utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair maior informação dos dados. Isso acabou por gerar procedimentos e domínios de informações que não seriam possíveis, ou não teriam sentido sem o conhecimento dessas ferramentas matemáticas para a análise de dados (NETO e MOITA, 1998).

Chen e colaboradores (2008) demonstraram as vantagens de se utilizar a cromatografia *fingerprint* aliado a métodos quimiométricos para controle de qualidade de plantas medicinais. Nesta pesquisa, amostras de diferentes regiões na China de *Ganoderma lucidum* foram analisadas por CLAE e, em seguida, submetidas à análise quimiométrica. No estudo foi possível demonstrar as semelhanças e diferenças das espécies, quantificar os principais marcadores químicos que influenciam nessa diferenciação e utilizar o método para o controle de qualidade desta espécie.

1.8.1 Análise Exploratória dos Dados

O principal objetivo de uma análise exploratória é extrair o máximo de informações dos dados experimentais, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. Os objetos químicos típicos são as amostras analíticas ou compostos químicos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, tais como a concentração, a intensidade das bandas em perfis cromatográficos, comprimento de onda em perfis espectroscópicos, etc (NETO e MOITA, 1998, MATOS *et al.*, 2003)

A análise exploratória dos dados é usada para determinar algumas relações gerais entre os dados, agrupando as amostras com características semelhantes. Esta técnica também auxilia na identificação de amostras que não seguem o padrão da maioria (BEEBE e SCASCHOLTZ, 1998)

Os métodos multivariados de análise de dados podem ser divididos em dois grupos: a aprendizagem não supervisionada e a aprendizagem supervisionada. Na aprendizagem não supervisionada o objetivo é encontrar agrupamentos naturais das amostras num espaço bidimensional. Os métodos mais utilizados são a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Já na aprendizagem supervisionada o objetivo é desenvolver modelos baseados nas informações da origem das amostras, para que estas sejam classificadas corretamente e então aplicar esta regra para amostras de origem desconhecidas visando sua classificação. Um método muito utilizado para modelagem é o modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA) (WOLD *et al.*, 1987; DERDE e MASSART, 1986; KOWALSKI e BENDER, 1972; LIU *et al.*, 1987) A seqüência básica da análise de dados multivariados por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 5.

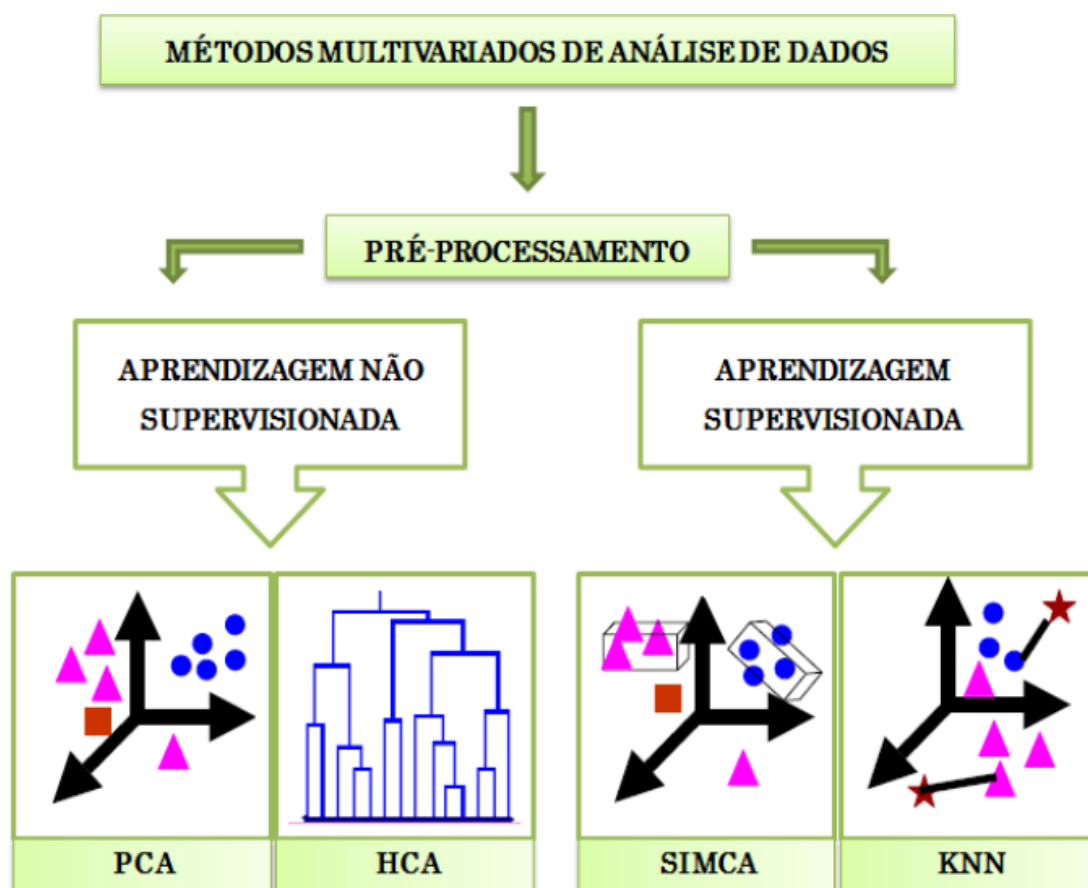


Figura 5: Esquema da seqüência usada na análise multivariada de dados experimentais.

1.8.2 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA é a base principal de diversos métodos de análise multivariada e seu grande objetivo é reduzir a dimensão dos dados originais, permitindo a fácil visualização das informações mais importantes em um número menor de fatores, ou componentes principais (PC). Desta forma, as principais vantagens da PCA estão na simplificação, modelamento, detecção de amostras anômalas, classificação e previsão (THOMAS, 1994).

Um procedimento básico para melhorar a análise de modo a reduzir a dimensão dos dados é a escolha do número de componentes principais a serem utilizadas na descrição do sistema. A escolha do número de componentes principais permite descrever até mais de 90% da variância dos dados com um número muito menor de fatores do que das variáveis originais. A escolha das componentes principais a serem utilizadas na descrição dos dados é feita levando-se em conta a porcentagem de variância descrita pelas PC's e a variância residual (THOMAS, 1994; VANDEGINSTE *et al.*, 1998).

A primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância das variáveis originais, ou seja, os auto vetores, num determinado eixo. A segunda componente, PC2, de segunda maior variância, é ortogonal a PC1, isto é, não correlacionada a ela. A terceira apresenta maior variância e é ortogonal às duas primeiras PC, portanto também não correlacionadas. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PC, que podem ser então confrontadas com padrões de características conhecidas (SILVA *et al.*, 2002).

A partir dos PC's são gerados dois novos conjuntos de dados chamados de *scores* e *loadings*. Os *scores* fornecem a composição das PC's em relação aos objetos (amostras) enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PC's são ortogonais, é possível examinar as relações entre os objetos através dos gráficos de *scores* projetados nas primeiras PC's, e entre as variáveis através dos gráficos de *loadings* (SENA *et al.*, 2000).

Utilizando a notação matricial, as componentes principais são obtidas por meio de transformações lineares conforme a equação:

$$XP = T$$

em que X é a matriz original do dados, T é a matriz de escores que contém as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos e P é a matriz dos pesos (*loadings*) onde os elementos de cada coluna correspondem aos coeficientes das combinações lineares das variáveis originais (THOMAS *et al.*, 1994).

Os dados originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Nestes casos, antes de se aplicar a PCA a dados numéricos, é necessário efetuar um pré-processamento nos dados originais. Os principais tipos de pré-processamento são o Centrado na média – CM e o Autoescalamento – AS (MORGANO *et al.*, 1999).

No CM calcula-se a média dos valores experimentais para cada variável e subtrai-se cada valor experimental do respectivo valor médio. Autoescalar significa centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio-padrão, sendo um para cada variável (MATOS *et al.*, 2003).

Gao e colaboradores (2006) relataram com êxito a utilização da PCA para avaliar a similaridade dos cromatogramas *fingerprint* de Chuanxiong obtidas de três regiões diferentes da China. Neste estudo foi possível diferenciar as amostras pelo gráficos de escores (PC1 versus PC2) de Chuanxiong e o método desenvolvido será útil para o controle de qualidade destas espécies.

1.8.3 Análise Hierárquica de Agrupamentos – HCA

A HCA é utilizada em análises exploratórias dos dados com o intuito de identificar possíveis agrupamentos e o valor provável do número de grupos ou classes (PRADO, 2015). É uma técnica que se baseia em uma medida de proximidade entre as amostras a serem agrupados, normalmente expressa como uma função da distância entre os dados. Essas podem ser medidas de similaridade ou dissimilaridade. Dentre as medidas de dissimilaridades mais usuais, a distância Euclidiana e a distância de Mahalanobis se destacam. A distância Euclidiana entre duas amostras (i e j) é definida pela raiz quadrada do somatório dos quadrados das diferenças entre os valores das coordenadas das amostras i e j para todas as variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$) (MATHWORKS, 2017):

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

onde x_{ik} representa o valor da medida instrumental da amostra i para a variável k ; x_{jk} representa a característica da amostra j e variável k ; e p representa o número de variáveis nos dados.

A distância de Mahalanobis é uma métrica que difere da distância Euclidiana por levar em consideração a correlação entre os conjuntos de dados. Seu uso corrige algumas das limitações da distância Euclidiana, pois considera a variabilidade dentro de cada unidade amostral, e não somente a medida de tendência central. Com isso, reduz a dependência das unidades de medição e a correlação entre variáveis, sendo, portanto, uma medida mais utilizada quando as variáveis são correlacionadas. De forma semelhante, outras métricas também podem ser empregadas (CHIAROTTI *et al.*, 2002; JANZEN *et al.*, 1992). Entre elas está o quadrado da função cosseno entre as amostras, a qual já foi utilizada em alguns trabalhos para a correlação de amostras de plantas (ESSEIVA *et al.*, 2005; DUJOURDY e BESACIER, 2008).

Métricas angulares, como ρ , possuem a vantagem de serem independentes da escala dos vetores envolvidos. Após a definição da métrica, para a execução da HCA deve ser escolhido ainda o critério de ligação entre amostras, sendo os mais utilizados os seguintes (MATHWORKS, 2017): ligação simples (conhecido também como critério do vizinho mais próximo); ligação completa (conhecido também como critério do vizinho mais distante); ligação média e critério de Ward. A ligação média pode ser definida de diferentes maneiras tais como: método de grupo por par ponderado com média aritmética (WPGMA, do inglês *weighted pair group method with arithmetic mean*), método de grupo por par não ponderado com média aritmética (UPGMA, do inglês *unweighted pair group method with arithmetic mean*), método centróide por par não ponderado (UPGMC, do inglês *unweighted pair group method with centroid mean*) e método centróide por par ponderado (WPGMC, do inglês *weighted pair group method with centroid mean*) (MÜLLNER, 2011)

Nesse trabalho, para a identificação das classes onde foram estudados os valores de ρ_L e ρ_{NL} , a HCA foi calculada com base no critério da ligação média calculada pelo método WPGMA. Neste método, a distância entre dois grupos é tratada como a média aritmética ponderada das distâncias entre todos os pares de elementos que podem ser formados com os elementos dos dois grupos que estão sendo comparados. Os resultados da HCA são apresentados na forma de um dendrograma que agrupa amostras em função

da similaridade ou dissimilaridade. Neste diagrama, a escala varia de zero (amostras sem similaridades) a um (amostras com elevada similaridade) (MAPA, 2011). Dessa forma, após a identificação dos possíveis agrupamentos, determinam-se os valores de ρ_L (menor valor intraclasse atribuído para as amostras consideradas ligadas) e ρ_{NL} (maior valor interclasse atribuído para as amostras consideradas não ligadas).



Fonte: http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/11/151127_plantas_poluicao_mdb

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem retomam as escrituras e ao Papiro de Ébers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Esse material foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII Dinastia, no Egito, e relata aproximadamente 811 prescrições e há 7000 drogas mencionadas (ANTUNES JUNIOR, 2002; VILELA, 1977). Esse material, talvez tenha sido uma das primeiras exposições sobre o uso de produtos naturais na cura de moléstias. (VIEGAS, 2006).

Durante o período anterior à Era Cristã que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras de história natural. Dentre esses destacam-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha de remédios (*Natura medicatrix*) e o Teofrasto (372 a.C), discípulo de Aristóteles. É seu o registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina (VALLE, 1978). Evidências arqueológicas mostram que o uso de drogas vegetais era amplo em culturas antigas. Nozes de bétele, uma planta aromática que contém substâncias psicoativas, eram mascadas há 13 mil anos no Timor; artefatos descobertos no Equador estendem o uso das folhas de coca a 5000 anos atrás; a civilização árabe, no século VII, descreveu o emprego dos purgativos e cardiotônicos de origem vegetal; as culturas americana, especialmente a Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca consignaram a civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas vegetais de valor terapêutico, até hoje indispensável a medicina moderna (MARINIBETTÒLO, 1974).

Na Bíblia, tanto no Antigo como no Novo Testamento, há muitas referências a plantas curativas ou os seus derivados, como por exemplo, o aloés, o benjoim e a mirra (SILVA, 2002). Já na Idade Média, ressalta-se o “estudo dos alquimistas, os quais foram precursores dos atuais farmacobotânicos, pois na busca do elixir da longa vida, descobriram a ação medicinal de várias plantas” (BERG, 1982). Nesse período de destaques das plantas, muitos profissionais médicos se sobressaíram como “Nostradamus, que debelou pragas com suas poções mágicas, e Paracelso, que afirmava existir na natureza uma planta para tratar cada doença” (CODDINGTON, 1978).

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas como remédio foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado

descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Com a vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento (VEIGA, 2002). Desde então, populações de todo o mundo tem usado tradicionalmente, ao longo dos séculos, plantas na busca por alívio, cura de doenças e controle de pragas. (CUNHA, 2004). Essas espécies utilizadas na sabedoria popular têm se tornado objeto de estudo em muitos países e tem se tornado uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos, para as mais diversas doenças.

Cerca de 13.000 plantas são usadas como fármacos ou para a síntese de moléculas medicinais (MING, 1998). Estratégias modernas, na descoberta de novos fármacos na década de 80, baseadas no mecanismo de ação e modelagem molecular (computer assisted drug design, CADD), que permitam prever e explicar, ao menos teoricamente, as propriedades farmacológicas das moléculas. (YUNES, 2001). Essa mudança fez com que o estudo com plantas medicinais, pelo meio científico, indústria farmacêutica e órgãos de fomento, ficasse em segundo plano, embora grande parte da população dos países em desenvolvimento continuasse usando plantas ou preparações destas nos cuidados básicos de saúde. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, atualmente, um sentimento geral de decepção com a medicina convencional e o desejo de adotar um estilo de vida “natural” tem levado à utilização crescente de outras formas de terapia, inclusive em países desenvolvidos.

Dentro deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reiterou o compromisso em estimular o uso da medicina tradicional e medicina complementar para o período 2002-2005. Por sua vez, o Brasil em 2005, através do SUS, propõe a inclusão das plantas medicinais e fitoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde. Contanto que esses produtos a base de plantas atendam a legislação vigente. (BRASIL, 2006).

Para atender a essas exigências, várias normas devem ser cumpridas e isso serve também para a indústria dos produtos fitoterápicos. Garantir a qualidade do material vegetal é fundamental, devendo-se considerar os seus aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. Assim, além do teor de substância ativa e intensidade das atividades farmacológicas e toxicológicas, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga bacteriana, determinação do teor de água e da perda por dessecação, determinação de cinzas, pesquisa de material estranho, orgânico e inorgânico, como terra, areia, partes

de vegetais, insetos e pequenos vertebrados ou produtos oriundo destes (Farmacopéia IV Ed., 2000; Brasil, 2007).

Embora haja no país uma legislação que estabeleça critérios para a qualidade e normas para produção e comercialização desses produtos, estes ainda têm sido comercializados fora dos padrões estabelecidos, sem garantia da eficiência terapêutica ou da ausência de riscos à saúde (YUNES, 2001) e a ausência de farmacovigilância (BRANDÃO *et al.*, 2002). Nesse sentido, a qualidade dos produtos à base de plantas medicinais comercializados no Brasil é preocupante.

Pesquisas científicas têm apontado a presença de diversas irregularidades que comprometem a eficácia e colocam em risco a saúde do consumidor. Uma das causas para esse panorama tem sido o fato das indústrias responsáveis pela fabricação desses produtos serem basicamente constituídas por empresas de pequeno porte que funcionam precariamente (ZUCCOLOTTO *et al.*, 1999). Veiga-Junior e Pinto (2005) enfatizam que as pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são escassas, comprometendo a fiscalização do comércio por parte dos órgãos competentes.

Por exemplo, estudos realizados nas regiões sul e sudeste do Brasil alertam sobre as irregularidades dos produtos à base de plantas medicinais tais como: características organolépticas impróprias, contaminação microbiológica, adulterações, informações inadequadas, elevado teor de impurezas, ausência ou baixa concentração dos constituintes ativos, elevado teor de umidade e a presença de resíduos de pesticidas (CARVALHO *et al.*, 2004; ZARONI *et al.*, 2004; ZUIN *et al.*, 2004; AMARAL *et al.*, 2003; DUARTE e LIMA, 2003; SOUSA *et al.*, 2003; BELLO *et al.*, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2002; DUARTE e BARDAL, 2002; BARBOSA *et al.*, 2001; ZUCCOLOTTO *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 1998; FISCHER *et al.*, 1993). Em contrapartida, no nordeste brasileiro, região caracterizada pelo amplo uso de fitoterápicos, há poucos estudos avaliando a qualidade de produtos à base de plantas medicinais (AMARAL *et al.*, 2003).

O controle de qualidade de um produto fitoterápico é considerado uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima até a análise do produto final (FARIAS, 2004). As ferramentas empregadas para caracterizar esses produtos incluem a prospecção fitoquímica e o teor de marcadores - “componentes presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo, utilizados como referência no

controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos” - por espectroscopia UV-visível ou CLAE (BRASIL, 2010).

No caso de não se conhecer os princípios ativos do material vegetal, é importante que se procure a “impressão digital” da espécie selecionada. Esta é dada pelo perfil químico obtido por meio de métodos cromatográficos, o qual deve ser constante e deve servir como modelo para comparação com outras amostras submetidas à mesma forma de preparo. O perfil químico é dado pelas substâncias marcadoras e elas são específicas para cada vegetal ou grupo taxonômico (BAUER e TITTEL, 1996).

Sendo assim, se faz necessário determinar vários constituintes químicos para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade da pesquisa farmacológica e clínica. Nessa perspectiva, o conceito de fitoequivalência tem sido utilizado. Ele sugere que um cromatograma “*fingerprint*” ou “impressão digital” seja comparado com padrões que poderá ajudar na identificação de amostras autênticas e auxiliar na identificação de possíveis compostos utilizados em uma adulteração (Liang *et al.*, 2004). Muitas técnicas analíticas modernas têm sido utilizadas para a determinação da “impressão digital” ou *fingerprint* de plantas medicinais.

Na última década, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das mais utilizadas devido a sua facilidade de manuseio e por não estar limitada a volatilidade ou estabilidade dos compostos da amostra. No entanto, a otimização das condições para uma boa separação não são triviais por envolver fatores como fase móvel, ajuste de pH, pressão de bombas e tantos outros (DEGANI *et al.*, 1998).

Segundo Gan *et al.* (2006), a cromatografia *fingerprint* tem sido utilizada para verificar a autenticidade ou fornecer o controle de qualidade de plantas medicinais. A cromatografia tem a vantagem de separar um sistema complexo de fitoquímicos em subsistemas relativamente simples e, em seguida, apresentar o perfil químico da planta medicinal sob a forma de um cromatograma.

A técnica de cromatografia *fingerprint* vem atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica, especialmente por enfatizar a característica sistêmica dos componentes da amostra focando na identificação e estabilidade dos constituintes químicos observados. Esta análise foi introduzida e aceita pela OMS como estratégia para avaliação de ervas naturais, exigida pelo Drug Administration Bureau of China (DABC) para padronização das ervas medicinais chinesas e suas matérias primas, e ainda é recomendado por outras entidades como Food and Drug Administration dos Estados

Unidos (FDA) e a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (HOSTETTMAN *et al.*, 2003).

Segundo Xu *et al.* (2016), um *fingerprint* de uma planta medicinal é um cromatograma representando todos os componentes químicos presentes ou detectáveis no extrato. Com a ajuda do *fingerprint*, a autenticação e identificação de uma planta podem ser fielmente conduzidas até mesmo se a qualidade e quantidade dos constituintes químicos são desconhecidos. Assim, para avaliar a qualidade de uma planta medicinal, podemos considerar os múltiplos constituintes no extrato da planta, em vez de apenas um ou dois marcadores químicos.

A técnica de cromatografia líquida para obtenção de cromatogramas *fingerprint* de plantas medicinais fornece um grande conjunto de dados. No entanto, para que estes dados sejam convertidos em informação útil deve-se usar métodos matemáticos e estatísticos sofisticados (YAMAMOTO, 2006). A aplicação de métodos quimiométricos, nestes casos, aumenta consideravelmente a qualidade da “impressão digital” ou “*fingerprint*” obtido. Comparações avançadas de dados podem ser feitas utilizando a Análise dos Componentes Principais (PCA). Hoje em dia a quimiometria não é mais uma opção na análise de matrizes complexas como o *fingerprint* de plantas medicinais, mas sim uma ferramenta essencial (VILELA e DELLA, 2001)

Inúmeros metabólitos secundários podem ser encontrados nas plantas medicinais, incluindo compostos fenólicos bioativos como flavonóides, antocianidinas, taninos e outros. Os fenólicos de origem vegetal têm sido alvo de inúmeras pesquisas principalmente em função do seu potencial farmacológico como anticancerígenos, anti-mutagênicos, antioxidantes ou anti-inflamatórios (VINUESA *et al.*, 2008). Nesse sentido, compostos fenólicos têm sido utilizados como marcadores químicos no controle de qualidade de fitoterápicos cuja ação farmacológica é atribuída a esses compostos.

Visto que a má qualidade de um produto pode interferir na ação farmacológica preconizada para a espécie, potencializando efeitos indesejáveis, e que muitas plantas medicinais nativas sofrem ameaças que podem levá-las à extinção, pesquisas avaliando a qualidade de produtos a base de plantas medicinais e estabelecendo prioridades de conservação para espécies vegetais medicinais são essenciais.

Diante dos muitos problemas encontrados neste tipo de matéria-prima vegetal tais como excesso de umidade, presença de contaminantes entre outros, é necessário um controle de qualidade dos mesmos, para assegurar o consumo seguro desses produtos. Assim concretiza-se o desenvolvimento de um método de controle de qualidade químico.

Capítulo 3



Fonte: <http://www.anareyes.com.br/blog/post.php?id=44>

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologias para a análise e controle de qualidade de *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), *Schinus terebinthifolius* (aroeira), *Plantago ovata* (plantago), *Glycine max* (isoflavona de soja), *Cassia angustifolia* (sene) e seus fitoterápicos por meio da técnica de CLAE, UV-Vis e LC-MS

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar os diversos fatores envolvidos na seletividade e eficiência do método cromatográfico;
- ✓ Otimizar racionalmente a condição cromatográfica para a obtenção de *fingerprints* para cada espécie estudada;
- ✓ Obter *fingerprint* de amostras comercializadas em feiras;
- ✓ Analisar a similitude empregando técnicas de análise multivariada;
- ✓ Desenvolver método analítico para a determinação simultânea de marcadores para cada amostra estudada;
- ✓ Validar os métodos desenvolvidos no estudo conforme a legislação brasileira vigente;
- ✓ Validar os métodos através de análise por UV-Vis e LC-MS;
- ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos em análise de amostras comerciais para cada planta medicinal.



Fonte: <https://saude.abril.com.br/bem-estar/conheca-e-saiba-usar-37-plantas-medicinais/>

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 Material botânico

Para a realização deste trabalho foram selecionados dez cidades onde ocorre a venda de plantas medicinais e maior frequência de consumidores, localizados em pontos distintos do estado da Bahia (Figura 6), escolhidos com o objetivo de obter uma distribuição homogênea pelo estado, a citar: Salvador (1), Ilhéus (2), Porto Seguro (3), Jequié (4), Guanambi (5), Barreiras (6), Irecê (7), Euclides da Cunha (8), Juazeiro (9), Paulo Afonso (10). As amostras foram adquiridas no período de abril a agosto de 2014, através do nome popular das espécies: *Schinus terebinthifolius* (aroeira), *Glycine max* (isoflavona), *Rhamnus pursiana* (cáscara sagrada), *Plantago ovata* (plantago), *Cassia angustifolia* (sene) e por meio da compra de amostras em mercados populares, totalizando dez amostras. Exemplares de exsicata de *S. terebinthifolius*, *G. max*, *R. pursiana*, *P. ovata*, *C. angustifolia* foram depositados no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia sob o número HUESB – 3486, HUESB – 3782 HUESB – 4274, HUESB – 4698, HUESB – 4816, respectivamente.

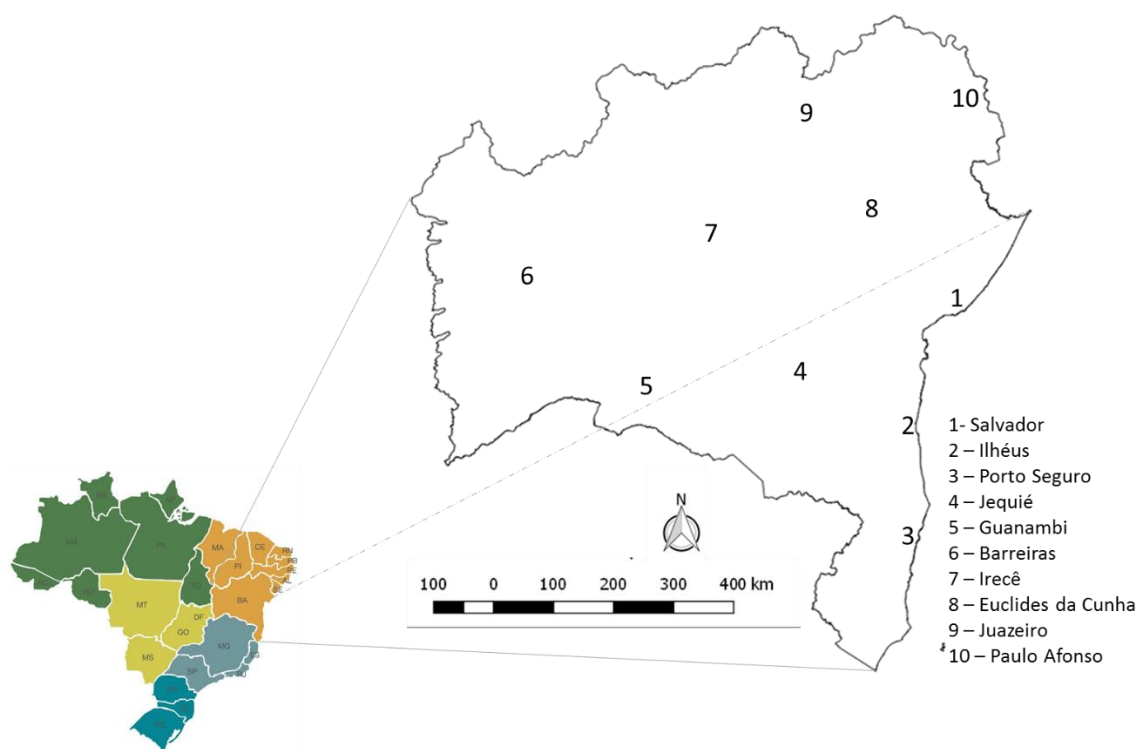


Figura 6: Mapa do estado da Bahia mostrado os locais de coleta das plantas medicinais. Em 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

4.2 Coleta de material fitoterápico

Amostras de fitoterápicos dessas mesmas plantas foram adquiridas em farmácias comunitárias na cidade de Salvador.

4.3 Padrões Químicos

Os solventes e os padrões para HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi produzida por um sistema de purificação de água UV Sartorius Arium® 611 (Göttingen, Alemanha).

4.3.1 Padrões utilizados para *S. terebinthifolius*

Os padrões de referência de aroeira utilizados foram: ácido gálico (99%), o ácido clorogênico (99%), a rutina (96,5%), a catequina (99%) e epicatequina (98%) e quercetina (99%), certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

4.3.2 Padrões utilizados para *R. purshiana*.

Os padrões de referência de cáscara sagrada utilizados foram: emodin 99,9 %, Casantranol 99,6 %), Aloe-emodin (99%), certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

4.3.3 Padrões utilizados para *G. max*.

Os padrões de referência de isoflavonas utilizados foram: daidzeína 99,9 %, gliciteína 96,3 %, genisteína 99,6 % (isoflavonas na forma aglicona), daidzina 99,2 %, glicitina 87,4 % e genistina 98,2 % (isoflavonas na forma glicosídica), certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

4.3.4 Padrões utilizados para *P. ovata*.

Os padrões de referência de plantago utilizados foram: L-arabinose, D-xilose, ranmose, ácido ursólico, ácido oleanólico e aucubina certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

4.3.5 Padrões utilizados para *C. angustifolia*.

Os padrões de referência de sene utilizados foram: Senosídeos A, B (99%), certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

4.4. Equipamento HPLC

Nesse experimento, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo de sistema Dionex UltiMate 3000 - sistema de HPLC com amostrador automático, detector de DAD gerenciado por um software Chromeleon®. Os cromatogramas foram obtidos usando a coluna de HPLC analítica COLUNA HPLC NUCLEODUR C18 5µm 150x4,6mm.

4.4.1 Condições cromatográficas *S. terebinthifolius*

Para obter resoluções razoáveis e evitar o corte do pico, foi realizada uma otimização do método proposto usando colunas C18. A fase móvel consistiu numa mistura (v / v) de ácido fósfórico 1% (componente A) e acetonitrila (componente B), sistemas de gradiente conforme Quadro 2 e Figura 7 a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, temperatura do forno a 35 °C.

Quadro 2: Sistema de gradiente de eluição otimizado em HPLC para *S. terebinthifolius*

Tempo (minutos)	Composição da fase móvel
0	100% de A
30	80% de A
45	80% de A
60	70% de A
80	60% de A
90	50% de A
100	15% de A
110	100% de B

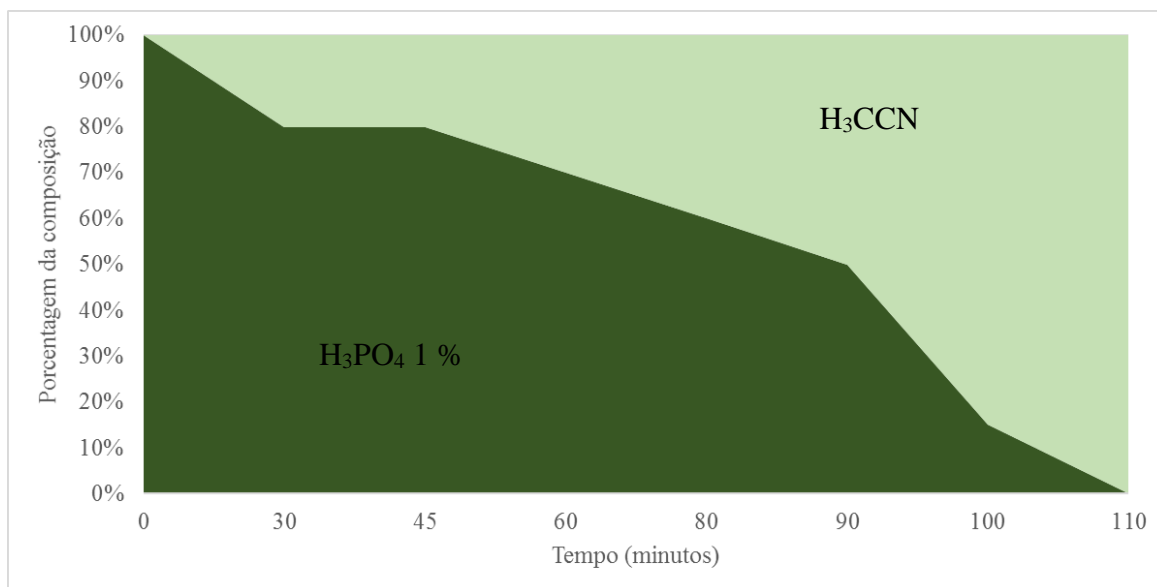


Figura 7: Gráfico do sistema de eluição em HPLC para *S. terebinthifolius* composto de ácido fosfórico 1% (sistema A) e acetonitrila (sistema B).

4.4.2 Condições cromatográficas *R. purshiana*

Para a obtenção do cromatograma de cáscara sagrada com boa resolução dos picos, a fase móvel consistiu numa mistura (v / v) de ácido trifluoracético 0,05% (componente A) e acetonitrila (componente B), em modo rampa conforme Figura 8 a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, por 120 minutos, temperatura do forno a 35 °C, volume de injeção de 10 µL.

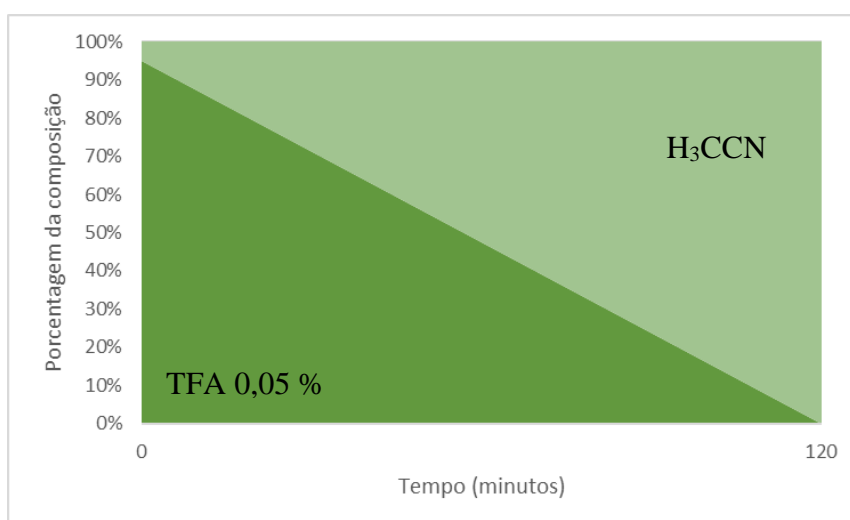


Figura 8: Gráfico do sistema de eluição em HPLC para *R. purshiana* composto de ácido trifluoracético (TFA) 0,05% (sistema A) e acetonitrila (sistema B).

4.4.3 Condições cromatográficas *G. max*.

Para a análise das isoflavonas presentes em *G. max*, após otimização, a fase móvel consistiu numa mistura (v/v) de Acetonitrila (componente A) e água (componente B), ambas contendo ácido fórmico 0,1%, modo gradiente, Quadro 3 e Figura 9 a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, por 90 minutos, temperatura do forno a 35 °C, volume de injeção de 10 µL.

Quadro 3: Sistema de gradiente de eluição otimizado em HPLC para *G. max*.

Tempo (minutos)	Composição da fase móvel
0	100% de B
0-30	100-80% de B
30-42	Isocrático com 80% de B
42-60	80-15% de B
60-80	Isocrático com 15 % de B
80-90	15-0% de B

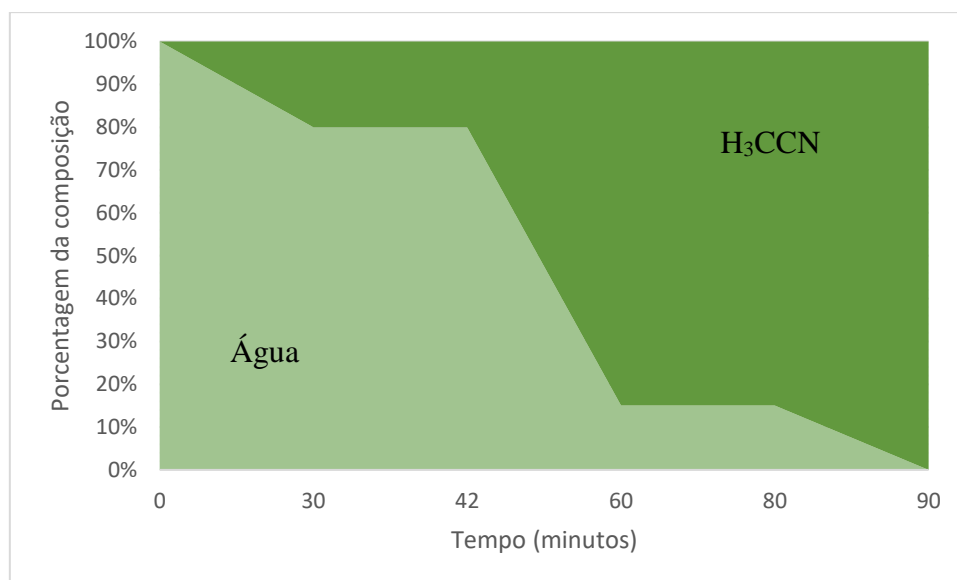


Figura 9: Gráfico do sistema de eluição em HPLC para *G. max* composto de Acetonitrila (sistema A) e água (sistema B).

4.4.4 Condições cromatográficas *P. ovata*.

Para avaliação de *P. ovata* a fase móvel consistiu numa mistura (v / v) de Metanol (componente A) e água/MeCN pH 2,5 ajustado com TFA 0,1% (componente B), em modo gradiente, conforme Quadro 4 e Figura 19 a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, por 80 minutos, temperatura do forno a 30 °C, volume de injeção de 10 µL.

Quadro 4: Sistema de gradiente de eluição otimizado em HPLC para *P. ovata*.

Tempo (minutos)	Composição da fase móvel
0 - 15	100 - 85% H ₂ O/MeCN
15-30	85 - 77,5% H ₂ O/MeCN
30-45	77,5 - 60% H ₂ O/MeCN
45-60	60-30 % H ₂ O/MeCN
60-80	30 -0% H ₂ O/MeCN

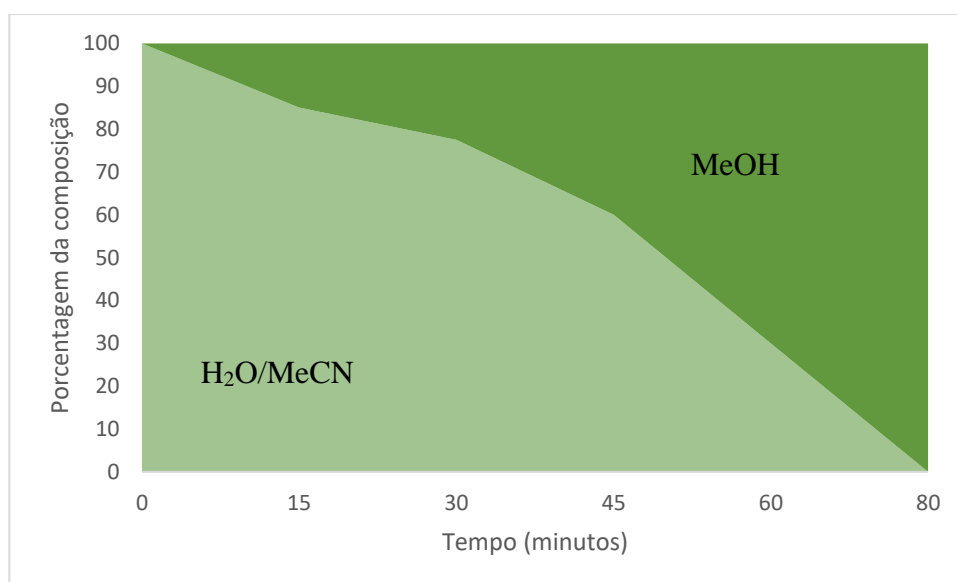


Figura 10: Gráfico do sistema de eluição em HPLC para *P. ovata* composto de Metanol (componente A) e água/MeCN pH 2,5 ajustado com TFA 0,1% (componente B).

4.4.5 Condições cromatográficas *C. angustifolia*.

Para a obtenção do cromatograma de sene, após otimização das condições, a fase móvel consistiu numa mistura (v / v) de ácido fosfórico 0,2% (componente A) e acetonitrila/água 50%, (componente B), em modo gradiente, conforme Quadro 5 e Figura 11 a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹, por 100 minutos, temperatura do forno a 35 °C, volume de injeção de 10 µL.

Quadro 5: Sistema de gradiente de eluição otimizado em HPLC para *C. angustifolia*.

Tempo (minutos)	Composição da fase móvel
0 – 30	100 - 80% H ₂ O/MeCN
30 – 42	Isocrático a 80% de H ₂ O/MeCN
42 – 60	80 a 15% H ₂ O/MeCN
60 – 80	Isocrático a 15% de H ₂ O/MeCN
80 – 100	15 -0% H ₂ O/MeCN
90 – 100	100% MeCN

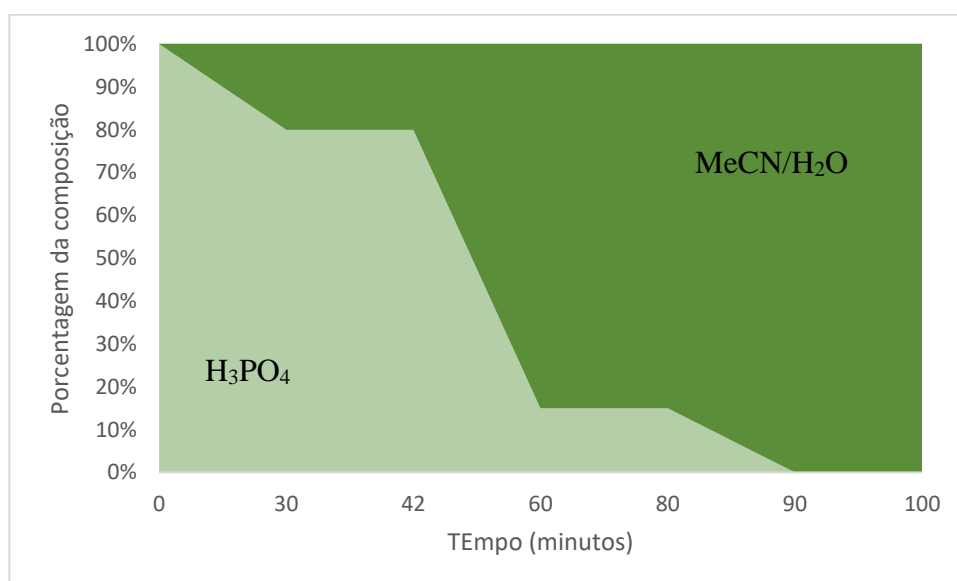


Figura 11: Gráfico do sistema de eluição em HPLC para *C. angustifolia* composto de ácido fosfórico 0,2% (componente A) e acetonitrila/água 50%, (componente B).

4.5 Preparação dos extratos

As amostras comerciais coletadas em feiras foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 48 horas. Logo após, as amostras foram fragmentadas em moinho de facas. Cerca de 100 gramas do material vegetal e 50 gramas de fitoterápicos foram submetidos ao processo de maceração, em frascos de vidro de boca larga, com 1000 e 500 mL, respectivamente, utilizando mistura binária de álcool/água 70% como solvente extrator. Os extratos permaneceram em maceração por sete dias, com agitação diária. Finalizando o período de extração, os mesmos foram filtrados através de gaze e papel filtro e concentrados em rotaevapor (Laborota 4000 eco) para redução de volume (MATOS, 1997). Os extratos foram transferidos para recipientes limpos e identificados. Em seguida, as amostras foram secas a temperatura ambiente.

4.6 Preparo das amostras

Os extratos de cada planta foram pesados com precisão e redissolvidos em solução EtOH-H₂O (3:7) à concentração final de 10 mg / mL e submetidos a sonicação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as soluções das amostras foram filtradas através de membrana Millipore de 0,45 e 0,22 µm antes da injeção.

4.7 Preparo dos marcadores químicos

As amostras dos marcadores químicos foram preparadas a partir de aproximadamente 10 mg de cada padrão e diluídos com água em balão volumétrico de 10,00 mL. Em seguida, colocou-se em ultrassom até a total solubilização da amostra. Alíquotas de 1,00 mL foram retiradas e avolumadas para 10,00 mL com água e homogeneizado, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹.

4.8 Validação

O método foi validado de acordo com as diretrizes contidas na Resolução-RE n 899, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2003). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), especificidade e robustez. As análises estatísticas foram realizadas

usando o pacote de software Statistica. Um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

4.8.1 Especificidade

A especificidade foi determinada pela análise do perfil cromatográfico (tempo de retenção e resolução) das amostras. Para verificar a presença de substâncias co-eluentes, a pureza do pico foi avaliada usando um detector UV / DAD. Uma solução padrão contendo os compostos estudados foi comparada à solução de extrato hidroalcoólico. Os perfis espectrais dos picos para cada substância foram comparados com os observados para os picos obtidos no mesmo tempo de retenção para as amostras. A pureza foi avaliada com base na Percentagem de semelhança entre os dados dos espectros.

4.8.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada para soluções padrão e extrato. As amostras foram preparadas como mencionado acima. Para soluções padrão, foram analisadas sete concentrações para cada composto em triplicata: 1,00, 5,00, 10,00, 25,00, 50,00, 75,00, 100,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e sete soluções preparadas a partir do extrato foram analisadas em triplicado a 1,00, 2,00, 2,5, 5,00, 10,00, 15,00 e 20,00 mg.mL^{-1} . Além da análise dos brancos.

4.8.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas através da realização de três ensaios replicados em três concentrações diferentes de cada analito: 25,00, 50,00 e 10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.8.4 Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de detecção (LOD)

Os LOD e LOQ foram determinados com base no desvio padrão da intercepção “y” conforme descrito na Resolução RE-899, 2003 (ANVISA, 2003).

4.8.5 Robustez

A robustez do método foi verificada variando taxa de fluxo (0,8 e 1,2 mL.min⁻¹). Uma solução padrão foi injetada para cada condição, e os parâmetros de adequação do sistema foram então calculados.

4.8.6 Estabilidade

A estabilidade das soluções padrão e das amostras foi determinada por comparação da concentração de cada composto nas soluções recentemente preparadas com níveis aqueles depois de armazenamento à temperatura ambiente e a 4 °C durante 12 h e 30 dias, respectivamente.

4.8.7 Validação através da técnica ultravioleta visível

Para a análise por espectroscopia no UV-VIS foram analisadas as soluções descritas na Tabela 1. As soluções foram analisadas em triplicata no espectrofotômetro Marca Varian, Modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa espectral de 200 a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

Para cada amostra foram realizadas diluições em balão volumétrico com etanol 70%, conforme Tabela 1. As soluções de material vegetal foram preparadas conforme item 4.6. Todas as soluções obtidas foram analisadas em seguida por espectroscopia de absorção no UV-VIS.

Tabela 1: Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras vegetais e aditivadas com os padrões para a PCA

Balão	Solução de material vegetal (mL)	Volume da solução padrão adicionada (1 mg.mL ⁻¹)	Volume final (mL)	Concentração final do padrão (mg.L ⁻¹)
1	1	-	10	0
2	1	5,0	10	0,5

4.8.8 Validação através de LC-MS

Para a validação da metodologia e confirmação dos padrões através de cromatografia de massas, foram utilizadas soluções de amostrais de cada espécie estudada. Para tanto, 10,00 µL de cada amostra a 5 mg/mL foram injetadas no equipamento LC-MS com as seguintes especificações. **Amazon Speed ETD:** Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C; HPLC: Controladora: CBM-20A- Shimadzu, Bombas: LC-20AD Shimadzu, Detector: SPD-20A – Shimadzu, Forno: CTO-20A – Shimadzu, Autoinjeter: SIL 20AC – Shimadzu.

Os espectros de massa podem ser verificados no Apêndice A-E.

4.9 Análise Estatística

Os espectros foram salvos no formato *Comma Delimited* (CSV) e exportados para o software OriginPro® 8.

Para análise dos dados, foram utilizadas as médias das absorbâncias obtidas para cada solução (UV-Vis) e a área do Pico (HPLC), no comprimento de onda de cada padrão. Os dados foram tratados no software Microsoft Office Excel® 2016, construída a curva de concentração e determinação da equação da reta.



Fonte: <https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/schinus-terebinthifolius>

Aroeira

5. AROEIRA

5.1 *Schinus terebinthifolius* RADDI

O interesse em estudar a espécie *S. terebinthifolius* (aroeira) se deu pelo fato da sua grande utilização popular em virtude das várias propriedades medicinais que apresenta. Além disso, atualmente, é uma das espécies vegetais listadas pelo Ministério da Saúde na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

Desse modo, considerando as circunstâncias anteriormente descritas e com base em diversos ensaios farmacológicos realizados com esta espécie vegetal, uma indústria farmacêutica pôde desenvolver um medicamento, a base de *S. terebinthifolius*, utilizado para o tratamento de infecções vaginais. Tradicionalmente, as espécies desta família, são empregadas na medicina popular como, cicatrizante, estomáquicas e antidiarréicas, pela presença de taninos e óleo-resinas (NOVAES *et al.*, 2003).

5.1.1 Características gerais

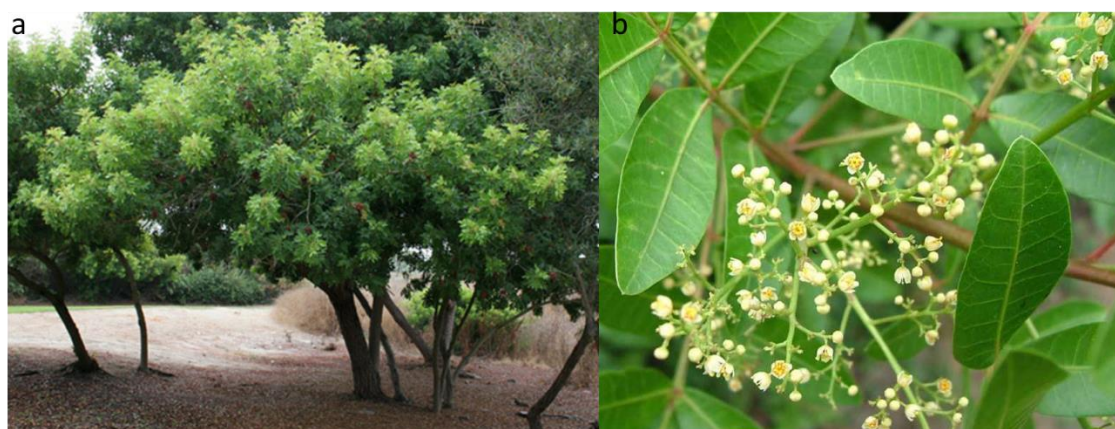
A espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* pertence à família Anacardiaceae que se encontra distribuída predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. Essa família compreende aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies, muitas dessas de importância alimentar, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), seriguela (*Spondias mombin* L.) e pistache (*Pistacia vera* L.). Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa (CORREIA *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2006; SALVI JÚNIOR, 2009). Muitos representantes desta família são utilizados na medicina tradicional, a exemplo das aroeiras. Sob essa denominação vulgar, incluem-se várias espécies, cujas folhas e cascas de caule são empregadas na terapêutica popular, a saber: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *S. lentiscifolius* Marchand (aroeira-do-campo), *S. molle* L. (aroeira-salso) e *Lithraea brasiliensis* Marchand (aroeira-brava) (KATO e AKISUE, 2002). Por conta do mesmo nome comum, que é atribuído a espécies medicinais diferentes, surgem confusões entre a população e no comércio. Inadvertidamente, uma espécie acaba sendo usada pela outra ou, intencionalmente, espécies correlatas substituem a *S. terebinthifolius* que é a espécie farmacopeica (SILVA, 1929; DUARTE *et al.*, 2009). *S. terebinthifolius* Raddi (Figura 12) é conhecida por diferentes nomes populares entre eles estão aroeira, aguaráiba,

aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-brejo, aroeira-do-campo, aroeira-do-Paraná, aroeira-do-sertão, aroeira-mansa, aroeira-negra, aroeira-pimenteira, aroeira-precoce, aroeira-vermelha, aroeira bálsamo, aroeira cabuí, aroeira cambuí, coração-de-bugre, corneíba, fruto-de-raposa e fruto-do-sabiá (LORENZI e MATOS, 2002).

Esta espécie apresenta distintas formas de crescimento, com ecótipos de porte variando desde pequenos arbustos (50 a 60 cm) até árvores com 15 metros de altura (REITZ *et al.*, 1983), dióica, perenifólia, de copa larga e tronco revestido de casca grossa (LORENZI e MATOS, 2002).

A casca apresenta-se em pedaços curvos ou enrolados em tubo, de comprimento variável, com 1 a 5 mm de espessura. Sua superfície externa é de cor pardo-acinzentada, profundamente fendida no sentido longitudinal e um pouco no sentido transversal. É muito rugosa, recoberta irregularmente de manchas mais claras e placas de líquens. A face interna é estriada longitudinalmente e apresenta cor pardo-avermelhada. Esta casca é impregnada de matéria resinosa que aparece frequentemente em sua superfície (SILVA, 1926).

Apresenta folhas compostas imparipinadas, medindo de 2,5 a 12 cm de comprimento, com 9 a 11 folíolos aromáticos. É uma espécie que desenvolve flores muito pequenas, diclinas, com diferenças nas estruturas reprodutivas, sendo maiores e mais floridas as inflorescências masculinas. As flores, brancas ou de cor amarela (Figura 12), são pequenas e agrupadas em inflorescências do tipo cacho (DUARTE *et al.*, 2006; LORENZI, 2002), possuem sexos numa mesma árvore ou em árvores diferentes. O florescimento ocorre principalmente durante os meses de setembro a janeiro.



<http://nathistoc.bio.ucl.edu/plants/Anacardiaceae/Schinus%20terebinthifolius.htm>

Figura 12: Exemplo de *Schinus terebinthifolius*. a) arvoredo e b) detalhe das folhas e flores.

Os frutos são do tipo drupa (Figura 13), globóides com cerca de 5 mm de diâmetro, aromáticos e adocicados, brilhantes e de cor vermelha quando maduros; possuem polpa avermelhada e comestível, o que torna a aroeira muito procurada pela avifauna. O sabor suave e levemente picante do frutos bem como sua agradável aparência, garantem o seu emprego em diversas preparações. Os frutos devem ser colhidos de janeiro a julho e a casca em qualquer período do ano (BORNHAUSEN, 2012).



Fonte: <http://www.plantasonya.com.br/arvores-e-palmeiras/aroeira-pimenteira-schinus-terebinthifolius.html>

Figura 13: Exemplar dos frutos de *S. terebinthifolius*.

A semente do fruto da aroeira é pequena, redonda e de coloração marrom escura, ocorrendo uma única semente por fruto. Está entre as muitas especiarias existentes utilizadas na culinária essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos. Amplamente utilizada na culinária internacional a semente do fruto se tornou muito popular na França, onde recebeu a denominação de poivre rose (pimenta-rosa), podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos (REITZ *et al.*, 1983; LENZI e ORTH, 2004; LORENZI e MATOS, 2002; GOMES *et al.*, 2004).

A espécie vegetal *S. terebinthifolius* (aroeira) apresenta ampla distribuição geográfica e alta plasticidade ecológica (LORENZI e MATOS, 2002). É uma espécie nativa da América tropical, no entanto, hoje pode ser encontrada em algumas partes da América Central, África, Ásia, em países da Europa e nos Everglades norte americanos, onde foi inserida com fins ornamentais e hoje é considerada praga ou planta invasora (MORTON, 1978; BAGGIO, 1988; DEGÁSPARI, 2005). No Brasil, é considerada planta típica da caatinga nordestina ocorrendo ao longo da mata atlântica, desde o Rio

Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (LORENZI e MATOS, 2002). O cultivo da aroeira pode ocorrer por meio de sementes ou por estaquia, por ser uma espécie dióica possui como estratégia de polinização a fertilização cruzada, dependendo basicamente de agentes bióticos para o transporte dos seus grãos de pólen, uma vez que os mesmos não são transportados pelo vento. A transferência de pólen é realizada exclusivamente por insetos, constituindo-se em sua maioria de abelhas, vespas e moscas, que visitam as flores masculinas e femininas ao longo do dia (LENZI e ORTH, 2004).

Schinus terebinthifolius é considerada uma espécie pioneira, pois apresenta crescimento rápido e se desenvolve muito bem a céu aberto, além de apresentar caráter agressivo competitivo (SOUZA, 2011). Tais características justificam o seu destaque ecológico em programas de reflorestamentos ambientais, recuperação de áreas degradadas, em projetos de reposição de mata ciliar e estabilização de dunas (LENZI e ORTH, 2004). A madeira obtida a partir dessa espécie é de cor parda ou amarelo-clara e bastante resistente, sendo de grande utilidade na construção civil, além de ser amplamente utilizada na arborização urbana (BOROS, 2007).

5.1.2 Aspectos etnobotânicos

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem significativamente para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002).

Dentre as várias abordagens para a seleção de espécies vegetais com potencial medicinal, as investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas têm sido as mais utilizadas pelos pesquisadores (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006). Tais abordagens fornecem maior probabilidade de descoberta de novas substâncias bioativas, através do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, implicando, assim, na economia de tempo e dinheiro, dois fatores muito buscados pelas economias ocidentais (MACIEL *et al.*, 2002).

A espécie vegetal *S. terebinthifolius* possui importância comercial, pois se trata de uma planta com propriedades medicinais. Consta oficialmente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1929) que indica as cascas do tronco como seu farmacógeno,

embora estudos demonstrem que as folhas e os frutos também apresentem substâncias ativas (SALVI JÚNIOR, 2009).

As partes mais utilizadas pela população e que apresentam propriedades medicinais são as cascas, folhas e frutos, no entanto, os indígenas das regiões tropicais também utilizam as sementes, a resina e a oleoresina (ou bálsamo) (PANETTA e MCKEE, 1997).

Levantamentos sobre o uso popular da aroeira demonstram várias ações medicinais para essa espécie, entre elas, adstringente, depurativa, anti-inflamatória, diurética, antidiarréica, febrífuga e antimicrobiana (BOROS, 2007). Segundo Sousa (2011), em um estudo que buscou verificar os principais fitoterápicos utilizados por mulheres, na cidade de Icó - CE, ficou constatado que a maioria utilizava a aroeira de forma isolada ou combinada. A aroeira é uma das plantas de uso ginecológico mais frequente e mais antiga na medicina popular brasileira, sendo a sua utilização muito difundida no Nordeste. O decocto da casca do caule tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e cervicovaginites, bem como em banhos de assento após o parto e como anti-inflamatório e cicatrizante (LORENZI e MATOS, 2002; AMORIM e SANTOS, 2003; SANTOS *et al.*, 2010).

Santos e Avelar (2011), após avaliarem, em um hospital do Rio de Janeiro, o percentual de mulheres que já haviam feito uso de alguma planta medicinal para tratamento ginecológico relataram que, dentre a parcela das usuárias, a maioria havia utilizado a aroeira para tal fim. As cascas do caule e as folhas são utilizadas usualmente na forma de decoto, com fins expectorante, antidiarréico, cicatrizante e antisséptico (PACIORNIK, 1990; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; DI-STASI e HIRUMALIMA, 2002; LORENZI e MATOS, 2002). A casca da aroeira também apresenta ação contra febre, hemoptises, doenças do sistema urinário e respiratório, além disso, da casca também pode ser extraído um óleo utilizado contra tumores e doenças da córnea (LORENZI e MATOS, 2002; DEGÁSPARI *et al.*, 2005; BOROS, 2007).

O decocto das cascas pode ainda ser utilizado na forma de bochechos ou gargarejos para tratar afecções da gengiva, garganta e estomatites, além de poder ser ingerido para combater azia, gastrite e úlcera péptica (XAVIER, 1995; MATOS, 2002; SANTOS *et al.*, 2010). Esta atividade merece maiores investigações químico-estruturais e farmacológicas, uma vez que pode ser útil para a síntese de novos fármacos como alternativa aos anti-inflamatórios que produzem irritação gástrica (JORGE e MARKMANN, 1996).

Infusões preparados com as cascas são tidos como antirreumáticos e eficazes contra úlceras, feridas de pele e mucosas em geral, acelerando o processo de cicatrização e atuando como antiinflamatório (SOUSA *et al.*, 2011). Com base ainda no uso popular, as cascas do tronco, bem como os frutos da aroeira são utilizados para o tratamento de gripes com febre, bronquite, feridas e inflamação no útero (BOSCOLO e VALLE, 2008).

Os frutos e as folhas são usualmente misturados em água para a lavagem de feridas e úlceras. As folhas são utilizadas também no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, inflamação uterina, infecção do trato urinário, gastrintestinal e respiratório (MARTINEZ *et al.*, 1996; GUERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; SOUZA, 2011).

5.1.3 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos

Estudos fitoquímicos e farmacológicos efetuados com essa espécie detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonoides, taninos, óleos essenciais, esteroides, triterpenos, antraquinonas e saponinas (JORGE e MARKMANN, 1996; QUEIRES e RODRIGUES, 1998; LIMA *et al.*, 2006).

Dentre os compostos fenólicos já foi confirmada a existência de forte concentração de taninos catéquicos - a essas substâncias, algumas vezes, é atribuída à responsabilidade pela bioatividade desta planta. Alguns trabalhos também já confirmaram a existência de ácido gálico livre (ARAÚJO, 2002).

O perfil fitoquímico obtido a partir de extratos oriundos das cascas do caule de *S. terebinthifolius* revela a presença de alto teor de taninos, biflavonoides e terpenoides, bem como saponinas (JORGE e MARKMANN, 1996; ARAÚJO, 2002; LORENZI e MATOS, 2002). Na casca também já foram identificadas duas chalconas diméricas, as urundeuvinas A e B (Figura 14) de forte ação anti-inflamatória (MATOS, 2002).

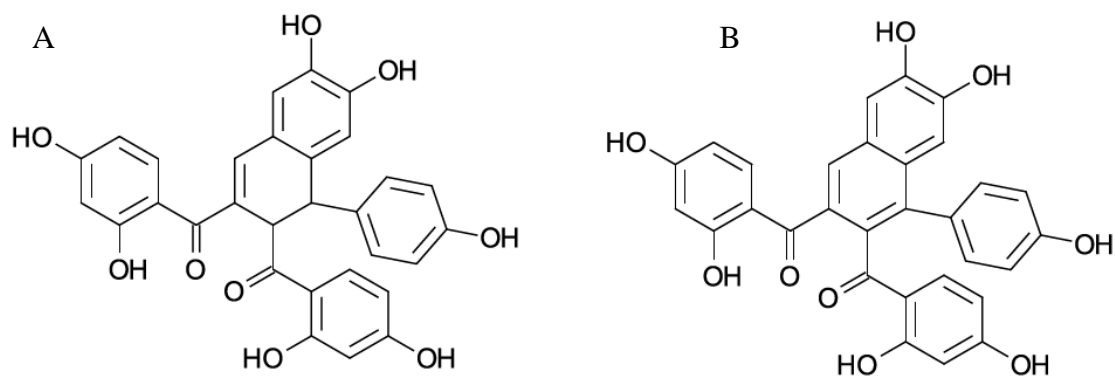


Figura 14: Representações estruturais (A) urundeuvina A e (B) urundeuvina B.

Tanto as cascas como as folhas são ricas em taninos e óleos essenciais, sendo que este último composto também pode ser encontrado nos frutos, onde também já foi identificada quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico (Figura 15). A única diferença significativa entre a composição das cascas e das folhas é no que se refere a presença de saponinas (Figura 16), pois estas estão restritas às cascas (JORGE e MARKMANN, 1996; DEGÁSPARI *et al.*, 2005).

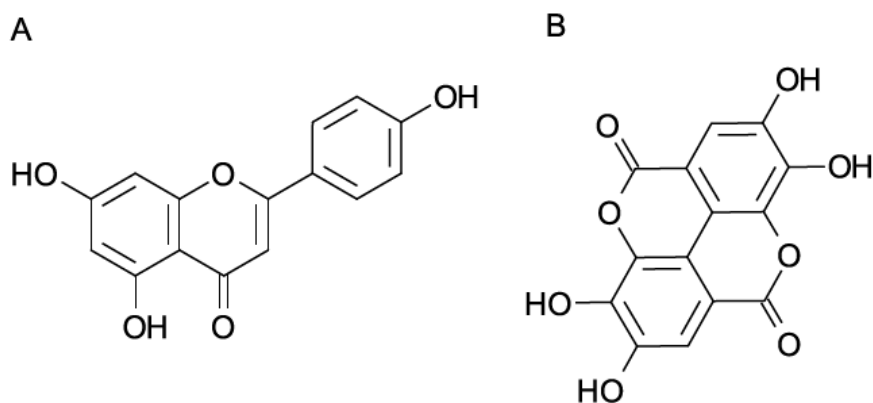


Figura 15: Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis: (a) Apigenina e (B) Ácido Elágico.

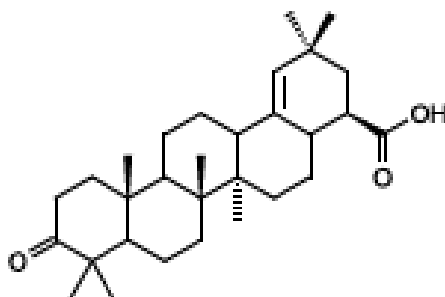


Figura 16: Saponinas isoladas da casca de *S. terebinthifolius*

A ação cicatrizante da droga se dá principalmente devido aos taninos, no entanto a ocorrência de flavonoides nas cascas indica uma potencialização desta ação devido a atividade anti-inflamatória atribuída a esses compostos (RIBAS *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstraram que os taninos, encontrados em grande quantidade nessa espécie vegetal, apresentam importante ação antimicrobiana, atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória e cicatrizante. As atividades farmacológicas

apresentadas pelos taninos devem-se a três características principais: capacidade de complexação com íons metálicos, sequestradores de radicais livres e capacidade de se complexarem com outras moléculas, incluindo macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) (SCALBERT, 1991; MONTEIRO *et al.*, 2005). Especificamente quanto a atividade antibacteriana desta classe de compostos acredita-se que esta seja devido à inibição de enzimas de bactérias e fungos, à ação direta na membrana dos microorganismos ou pela competição por íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano (SIMÕES *et al.*, 2001).

Os óleos essenciais encontrados nesta espécie vegetal são ricos em mono e sesquiterpenos, no entanto, há diferenças entre a proporção dessas substâncias. No óleo essencial obtido das folhas já foi demonstrado a presença de compostos químicos como sabineno, α -pineno, β -pineno, cariofileno, germacreno-D, biciclogermagreno, transcariofileno e limoneno (MOURA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007) (Figura 17).

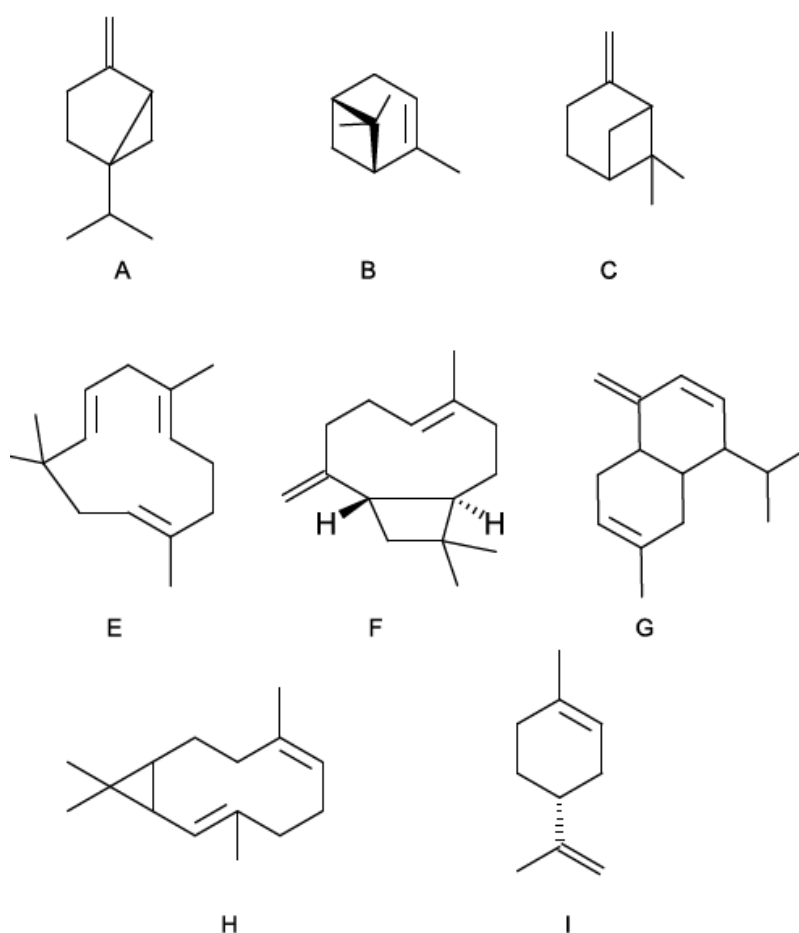


Figura 17: Representações estruturais (A) sabineno, (B) α -pineno, (C) β -pineno, (E) α -humuleno, (F) germacreno-D, (G) biciclogermagreno, (H) transcariofileno e (I) limoneno.

No que se refere ao óleo essencial obtido dos frutos, os compostos químicos identificados, predominantemente, foram os monoterpenos: α -3-careno e α -pineno, e os sesquiterpenos: β -gurjuneno, cis- β - guaiano, α -muuroleno, trans-calameno, cubenol e epi- α -muurolol (GEHRKE *et al.*, 2007). O óleo essencial, tanto das cascas quanto dos frutos, é indicado no tratamento de distúrbios respiratórios, devido a alta concentração de monoterpenos (Figura 18). Possui também atividade fungicida, sendo eficaz em micoses e candidíase, e atividade antibacteriana (DEGÁSPARI *et al.*, 2005).

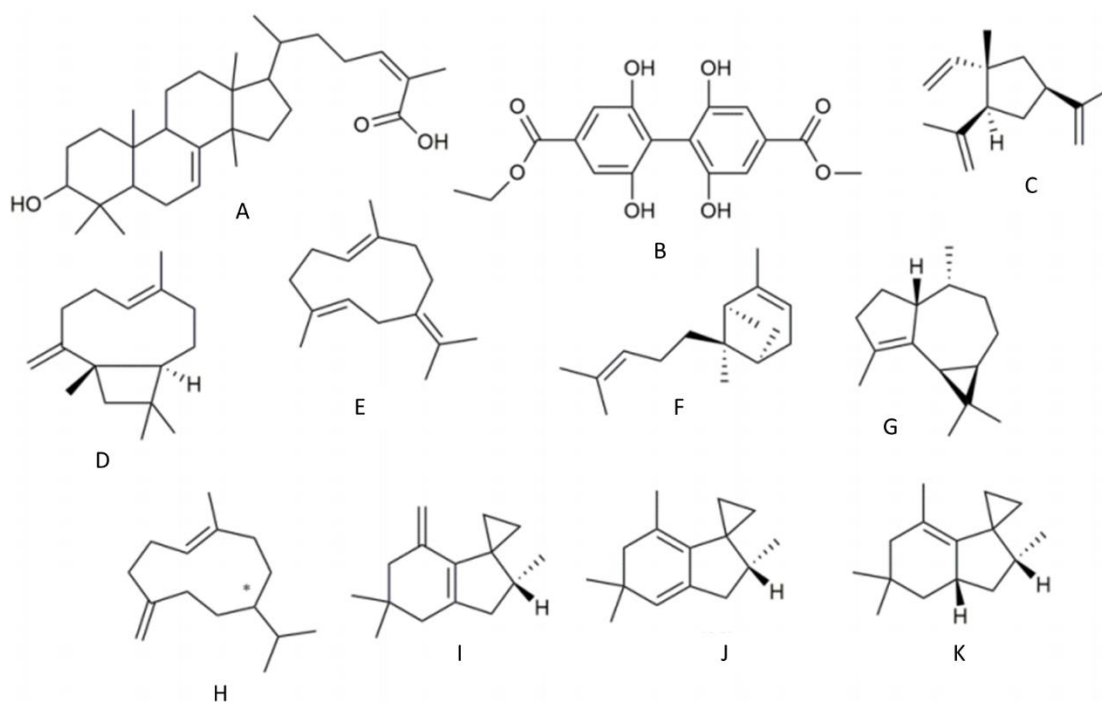


Figura 18: Representação dos constituintes dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* encontrados no fruto: (A) Schinol, (B) 4'-eti-4-metil-2,2',6,6'- tetrahidroxi[1,1'-bifenil]-4,4'-dicarboxilato, (C) (-)- β -elemeno, (D) (-)-(E)- β -cariofileno, (E) Germacreno B, (F); α - bergamoteno, (G) (-)- α -gurjuneno, (H); (\pm)-germacreno D, (I); α -humuleno; Alloaromadendreno; δ - cadineno; Terebanano, (J) Tereidenina, (K) Terebintina.

Os óleos essenciais atuam contra microorganismos causando instabilidade da membrana plasmática que conduz a ruptura de células. Esse efeito é devido a variedade de compostos antimicrobianos presentes nos óleos, como por exemplo, os terpenóides timol e carvacrol. Entretanto, embora a atividade antimicrobiana possa ser acentuada pela presença de um determinado composto químico, normalmente é resultado da sinergia

entre diversos compostos presentes nos óleos (TRIPANI e CHOWDHURY, 2001; BURT, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

Em todas as partes da planta foi identificada a presença de pequenas quantidades de alquil-fenóis, substâncias causadoras de dermatite alérgica em pessoas sensíveis, por este motivo preparações à base de aroeira devem ser utilizadas com cautela (LORENZ e MATOS, 2002; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005).

Devido a essa ampla gama de usos medicinais, tem crescido o interesse em aprofundar os conhecimentos acerca das propriedades biológicas dessa espécie e, para isso, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas.

As atividades farmacológicas descritas na literatura fornecem indícios que podem explicar, pelo menos em parte, alguns dos usos terapêuticos desta espécie pela população. Tomando por base estudo anterior que demonstrou a atividade antibacteriana de um extrato etanólico a 30% de folhas de *S. terebinthifolius* (MARTÍNEZ *et al.*, 1996). Guerra *et al.* (2000) também avaliaram e comprovaram a atividade antimicrobiana de um extrato etanólico a 80% das folhas de *S. terebinthifolius* em diferentes concentrações frente à cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* através método de difusão em ágar por perfuração. Com base nesses estudos Soares *et al.* (2007) propuseram-se a avaliar o efeito antibacteriano *in vitro* da tintura da casca de aroeira a 20% sobre o *Streptococcus mutans*, também pelo método de difusão em ágar por perfuração, bem como sua eficácia na descontaminação de escovas dentais contaminadas por tal micro-organismo.

A atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* também já foi demonstrada, *in vitro*, contra *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e outras espécies de fungos (MARTÍNEZ *et al.*, 1996). Tal atividade apresentada por esta espécie vegetal pode ser atribuída a diversas substâncias como a terebinthona, o ácido hidroximasticadienólico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico (AMORIM; SANTOS, 2003) (Figura 19).

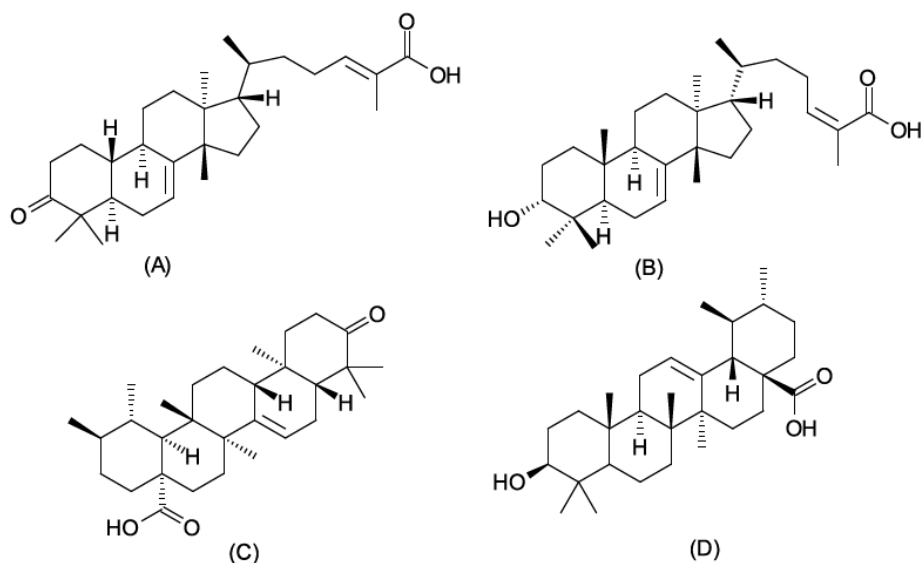


Figura 19: Representações estruturais de terebinthona (a), ácido hidroximasticadienóico (b), ácido terebinthifólico (c) e ácido ursólico(d).

Um dos usos mais recorrentes descrito para a aroeira refere-se ao tratamento de inflamações e infecções vaginais. Em função disso alguns pesquisadores buscaram comprovar a efetividade da aroeira para tal fim, os primeiros foram Wanick e Bandeira (1974) que realizaram um ensaio clínico não randomizado relatando bons resultados do ponto de vista colposcópico e citológico nas mulheres tratadas com o produto a base de aroeira. Silva (1999) utilizou, em seu estudo, produtos ginecológicos desenvolvidos a partir da *S. terebinthifolius*, no entanto, os resultados foram de difícil interpretação devido a alguns fatores complicadores do estudo (heterogeneidade de grupos-controle e definição inadequada do termo “colpíte” ou “corrimento”), não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos testados.

Já o ensaio clínico randomizado realizado por Amorim e Santos (2003) demonstrou a eficácia e segurança de um gel vaginal a base de extrato hidroalcoólico de aroeira no tratamento da vaginose bacteriana. Em virtude das pesquisas que comprovam a eficácia da aroeira no tratamento de vaginites e vulvovaginites foi possível o desenvolvimento de um gel vaginal à base de *Schinus terebinthifolius*, denominado Kronel®, que atualmente é produzido pela indústria farmacêutica Hebron® e bem aceito pela comunidade médica.

Em um estudo randomizado e duplo-cego realizado por Santos *et al.* (2010) para comparar a eficácia da aroeira, administrada por via oral, com a do omeprazol, utilizado como medicamento de referência, na gastrite com sintomas dispépticos associados, ficou

evidente a vantagem da terapia com aroeira na melhora dos sintomas associados à gastrite em relação ao omeprazol.

Martorelli e colaboradores (2011) avaliaram a atividade anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico a 30% em orabase de *S. terebinthifolius* através de teste *in vivo* comparando o efeito desse extrato com o de fármacos de uso clínico já consagrado, chegando a conclusão que o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* apresenta atividade anti-inflamatória e cicatrizante em feridas produzidas em pele de dorso de rato. Nesse estudo, a ação antiinflamatória foi verificada ser do tipo não-esteroidal pela inibição competitiva específica da fosfolipase A2. Tal atividade foi demonstrada por dois de seus componentes, o schinol e o ácido masticadienóico – triterpenos tetracíclicos -, mas também pode ser atribuída aos flavonoides que apresentam atividade anti-inflamatória pela inibição das enzimas envolvidas na síntese das prostaglandinas e dos leucotrienos – mediadores inflamatórios.

Por outro lado, o estudo realizado por Branco Neto e colaboradores (2006), o qual avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico da entrecasca da aroeira também na cicatrização de feridas abertas em dorso de rato, demonstrou retardo na reepitelização das feridas quando comparado com o grupo controle.

A atividade cicatrizante da aroeira também foi avaliada em alguns outros estudos que relataram o efeito de *S. terebinthifolius* na cicatrização de feridas cirúrgicas de bexiga e estômago e em linea alba de ratos (LUCENA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; NUNES JÚNIOR *et al.*, 2006). Desses, apenas o estudo que avaliou o efeito cicatrizante em estômago de ratos não apresentou resultado cicatrizante favorável. Essa diversidade nos resultados demonstra a necessidade da realização de mais estudos *in vivo* para comprovar o real efeito da aroeira no processo de cicatrização. Ensaio farmacológico de *S. terebinthifolius*, em diferentes modelos, apresentaram resultados que registraram a existência de propriedades antioxidante (VELÁSQUEZ *et al.*, 2003; EL-MASSRY *et al.*, 2009) e antitumoral (QUEIRES *et al.*, 2006).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.

5.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório

Os padrões de ácido gálico (Figura 20), o ácido clorogênico (Figura 21), a rutina (Figura 22), a catequina (Figura 23), epicatequina (Figura 24) e quercetina (Figura 25) na concentração de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram, inicialmente, injetados separadamente em análises cromatográficas na qual a fase móvel eluiu de forma exploratória. Procurando observar em qual porcentagem a Fase A (ácido fórmico 0,1%) e a Fase B (acetonitrila) encontravam-se durante a eluição e o tempo de retenção dos compostos.

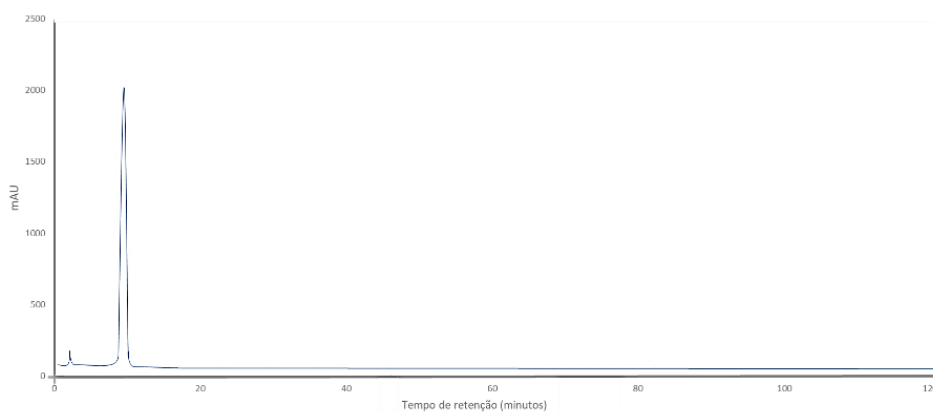


Figura 20: Espectro cromatográfico de ácido gálico obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 9,97 minutos.

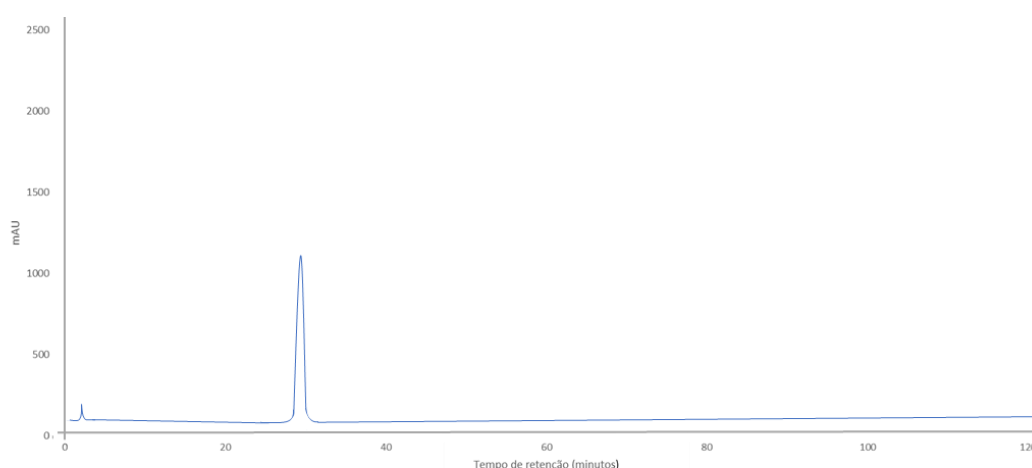


Figura 21: Espectro cromatográfico de ácido clorogênico obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 29, 00 minutos.

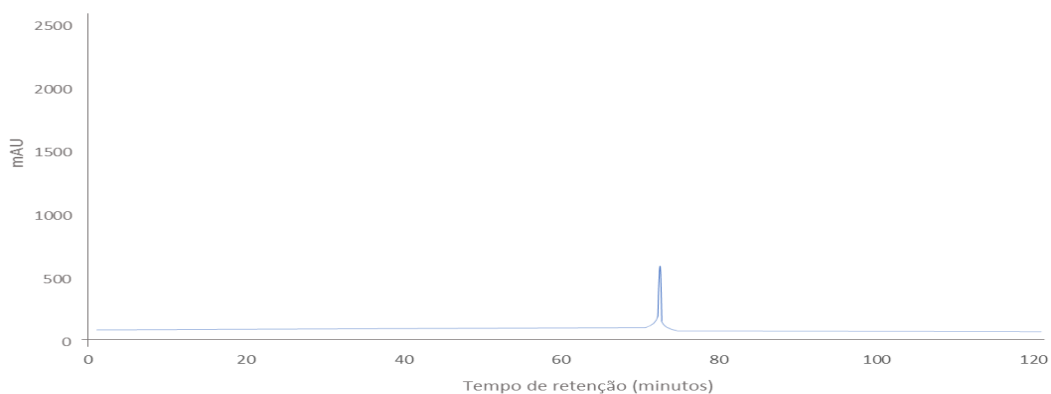


Figura 22: Espectro cromatográfico de rutina obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 71,98 minutos.

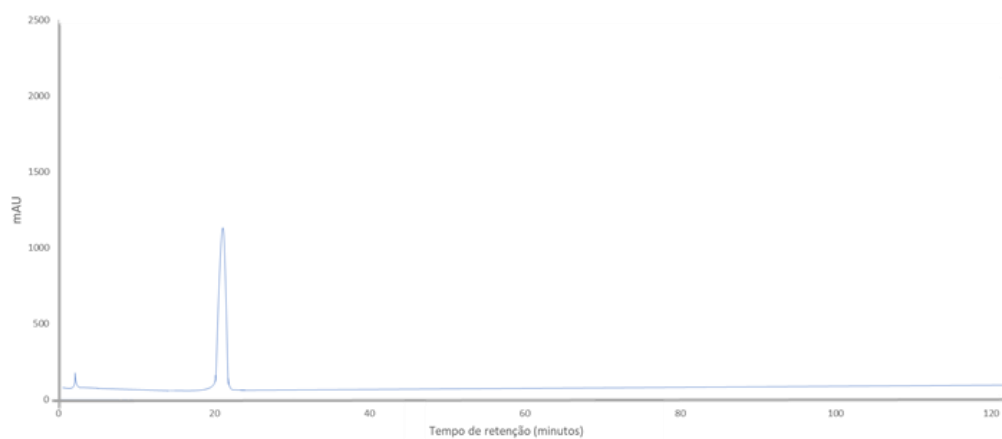


Figura 23: Espectro cromatográfico de catequina obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 21,12 minutos.

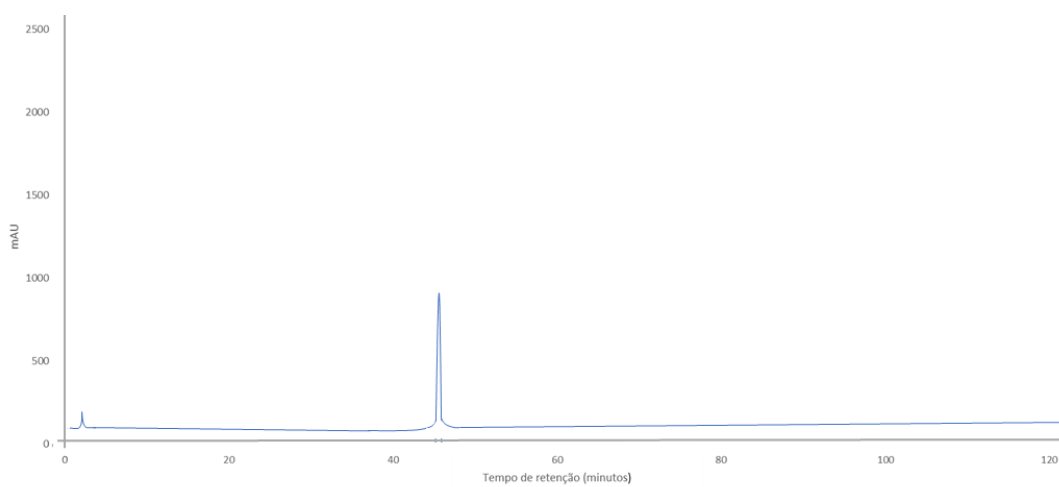


Figura 24: Espectro cromatográfico de epicatequina obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 45,40 minutos.

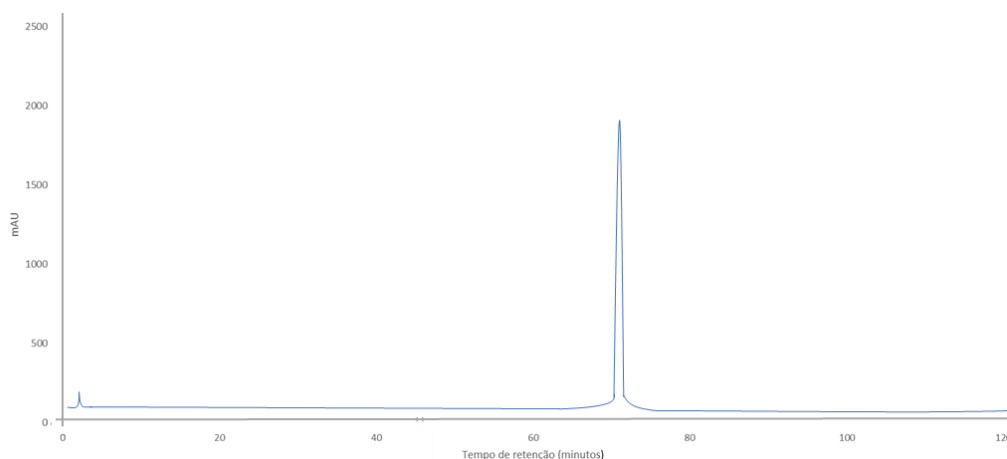


Figura 25: Espectro cromatográfico de quercetina obtido através de análise exploratório mostrando o tempo de retenção em 71,02 minutos.

A Tabela 2 resume os tempos de retenção, fator de retenção e fator de separação ou seletividade para cada amostra padrão em *S. terebinthifolius*.

Tabela 2: Combinação de eluição das amostras padrões de *S. terebinthifolius*: ácido gálico, ácido clorogênico, rutina, catequina, epicatequina e quercetina

Amostra	t_R	k	α
Ácido gálico	9,97	8,87	-
Catequina	21,12	19,91	2,24
Ácido clorogênico	29,87	28,57	1,44
Epicatequina	45,40	43,95	1,54
Quercetina	71,02	69,32	1,58
Rutina	71,89	70,18	1,01

* t_R = tempo de retenção (minutos); k = fator de retenção e α = fator de separação ou seletividade.

De acordo com Jardim e colaboradores (2006), a força cromatográfica da fase móvel adequada a uma separação é condicionada através da análise do fator de retenção (k), que deve estar num intervalo ideal sendo maior ou igual a 1 e menor ou igual a 10. Valores fora desse intervalo não são recomendados, seja por fornecerem separação pouco eficiente ou seja por implicarem em tempos de análise longo com alargamento de picos.

Dessa forma, pode-se observar que o sistema em questão apresenta valores de retenção na faixa adequada. Assim, o espectro sumarizado dos padrões é mostrado na Figura 26.

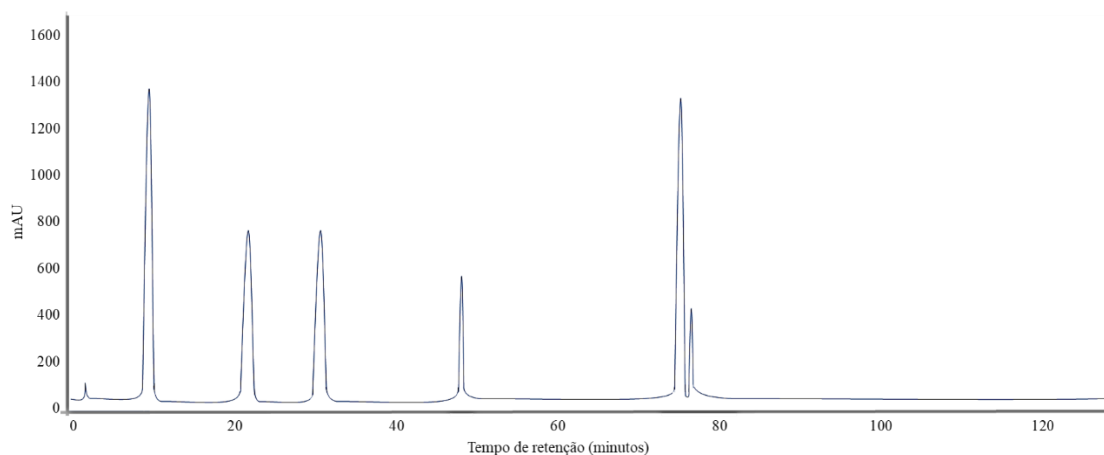


Figura 26: Espectro dos padrões combinados de *S. terebinthifolius*: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, quercetina e rutina, respectivamente.

O uso de ácidos na fase móvel é imprescindível para prevenir a ionização dos grupos hidroxilas presentes em compostos fenólicos, permitindo uma melhor separação e simetria do pico (CARVALHO *et al.*, 2009). O ácido trifluoracético é um ácido mais forte, tornando o pH da fase móvel mais ácido com a adição de uma menor quantidade quando comparado com o ácido acético.

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. O valor de resolução calculado foi acima de 2,0, o que mostra a total separação entre os picos. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA *et al.*, 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos seis marcadores.

5.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores

A varredura espectral de 200 a 900 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e assim uma melhor resposta de sinal cromatográfico. Considerando o espectro UV dos padrões obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos (Figura 27), o cromatograma dos padrões foi obtido em 265 nm (Figura 28).

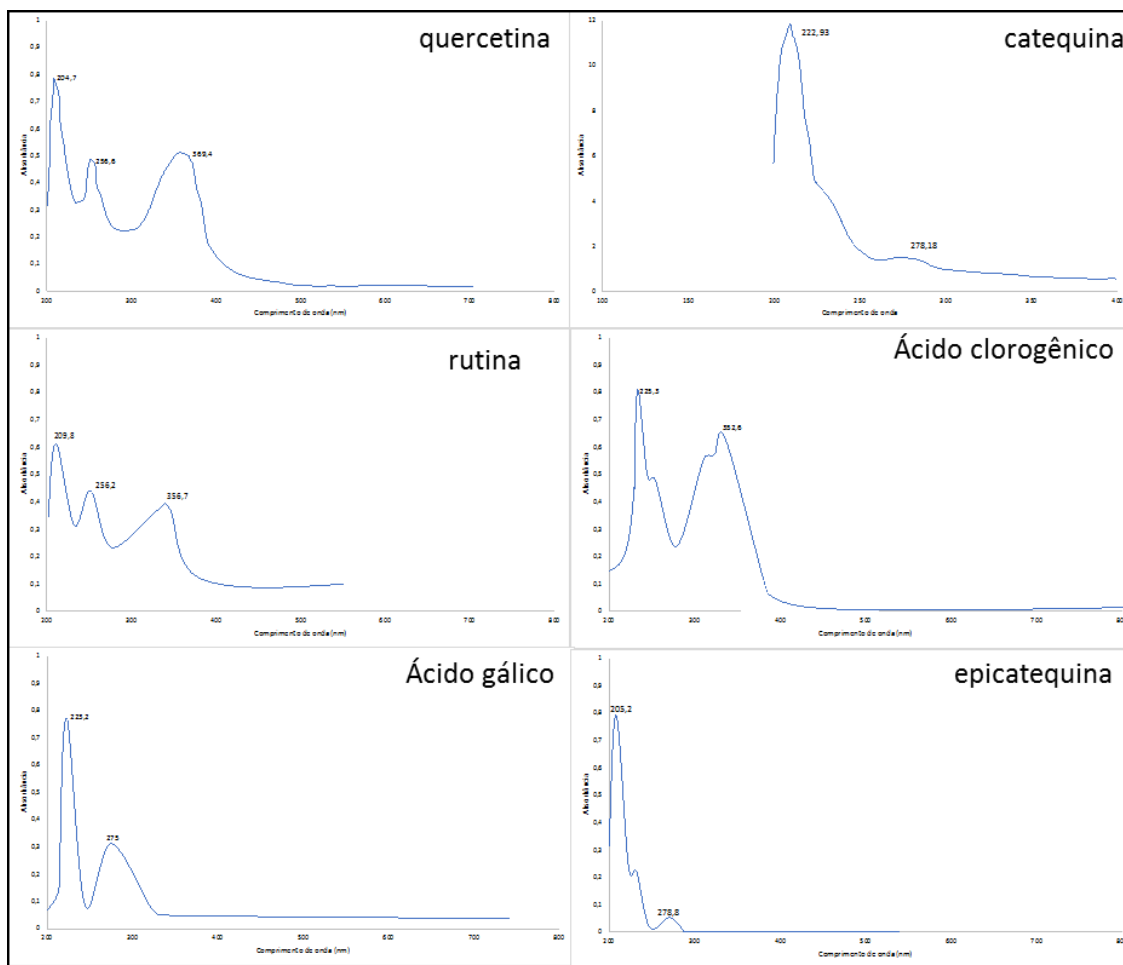


Figura 27: Espectro de UV dos picos do ácido gálico, ácido clorogênico, rutina, catequina, epicatequina e quercetina.

A identificação preliminar dos marcadores nas amostras estudadas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV, e confirmadas através da co-injeção de soluções dos padrões (Figura 28).

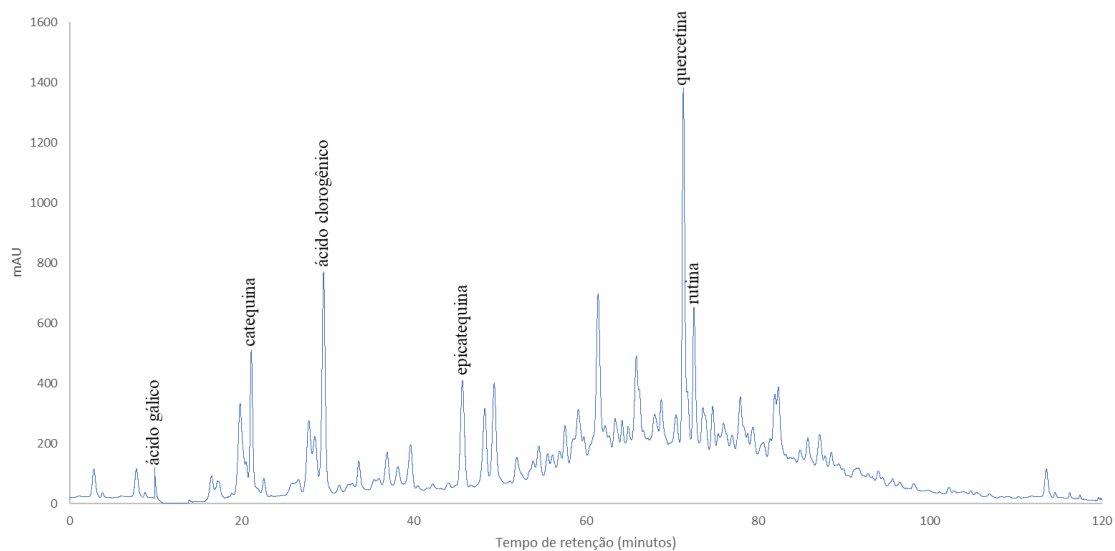


Figura 28: Cromatograma de *S. terebinthifolius* obtido em 265 nm.

De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 28, é possível observar que *S. terebinthifolius* apresenta taninos hidrolisáveis (derivados do ácido gálico) e taninos condensados (derivados da catequina). Enquanto que a presença de ácido gálico é discreto na amostra, a presença de quercetina é bastante pronunciada.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do método, novas análises foram conduzidas empregando comprimento de onda de 210 nm (Figura 29)

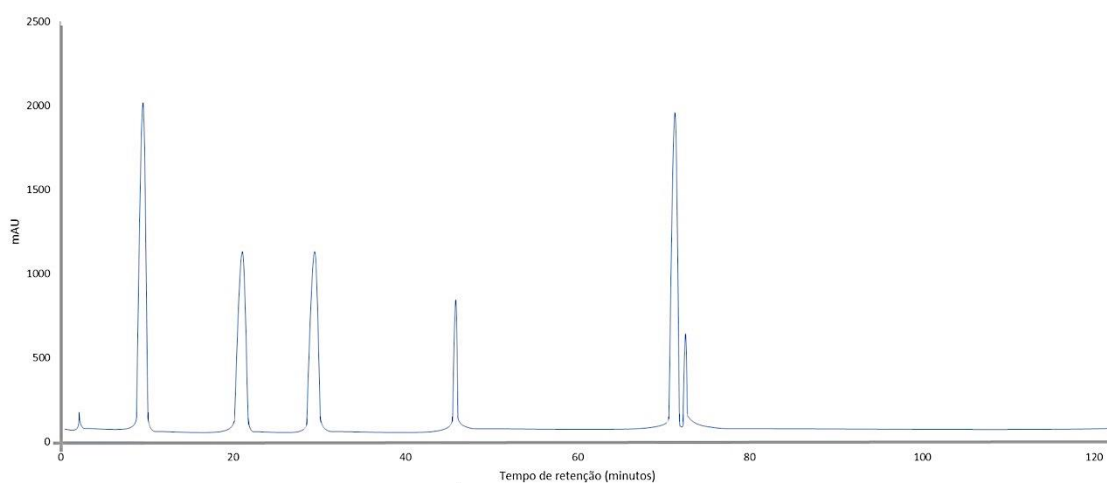


Figura 29 Cromatograma dos padrões de ácido gálico, ácido clorogênico, rutina, catequina, epicatequina e quercetina em 210 nm.

O cromatograma dos padrões obtidos em 210 nm apresentou aumento substancial na sensibilidade do método sem qualquer prejuízo para a performance (Figura 30). Tal comportamento se reproduziu durante a análise das amostras com incremento na resposta dos marcadores sem qualquer redução da capacidade de separação dos mesmos (Figura 30).

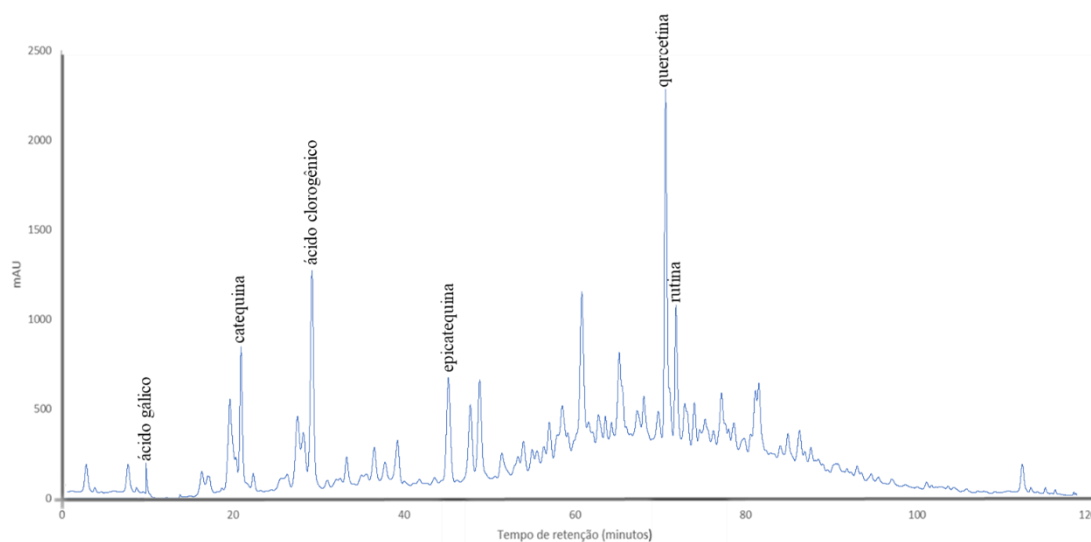


Figura 30: Cromatograma de *S. terebinthifolius* obtido em 210 nm

5.2.2 Validação do método analítico desenvolvido

5.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O diluente utilizado no preparo das amostras foi injetado nas mesmas condições para verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes, o que foi confirmado como se observa na Figura 31. Os picos que são registrados foram eluídos antes do ácido gálico que apresenta o menor tempo de retenção (9,97 minutos)

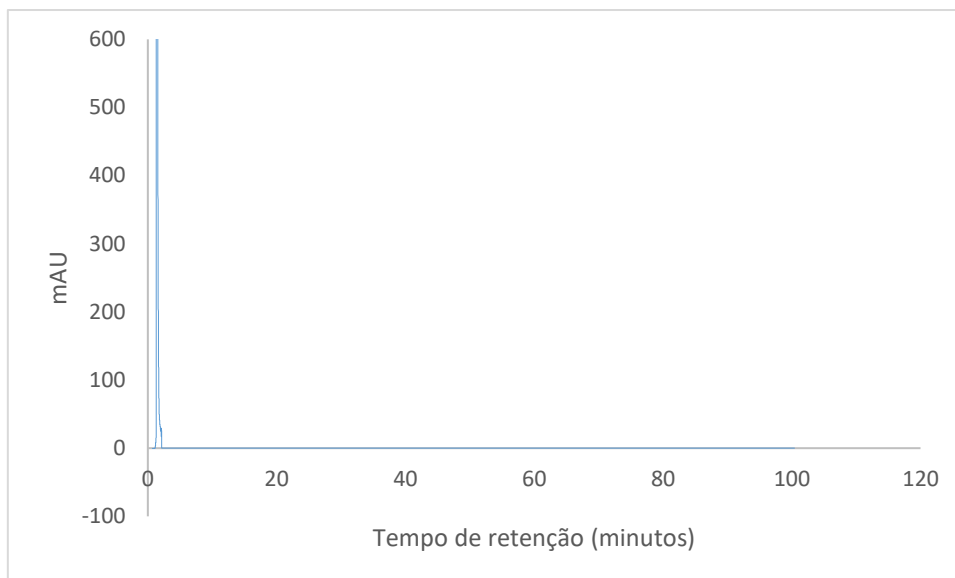


Figura 31: Análise cromatográfica do diluente (metanol) dos marcadores e amostra *de S. terebinthifolius*.

A pureza do pico também é aceita como uma das condições de avaliação do parâmetro de seletividade, sendo determinada pelo detector DAD (Figura 32-37).

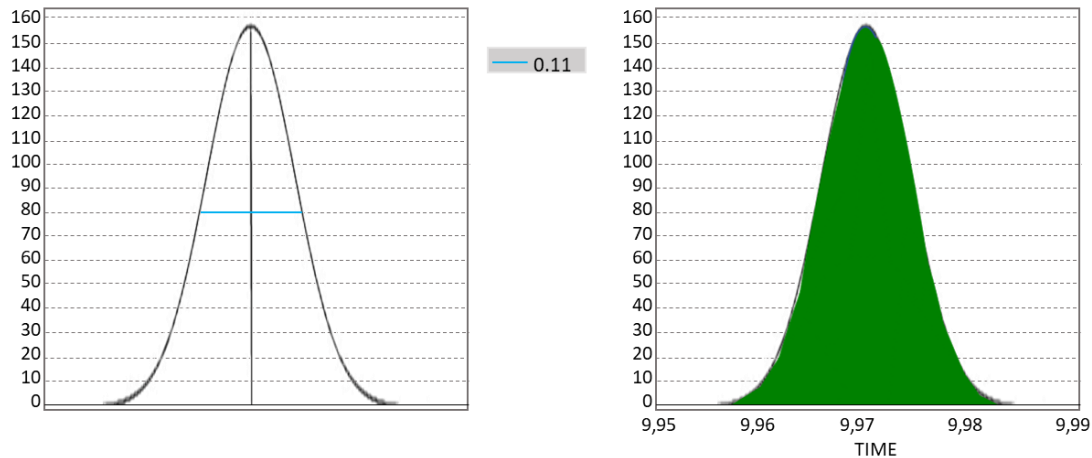


Figura 32: Análise da pureza do padrão de ácido gálico. A área verde corresponde à área pura.

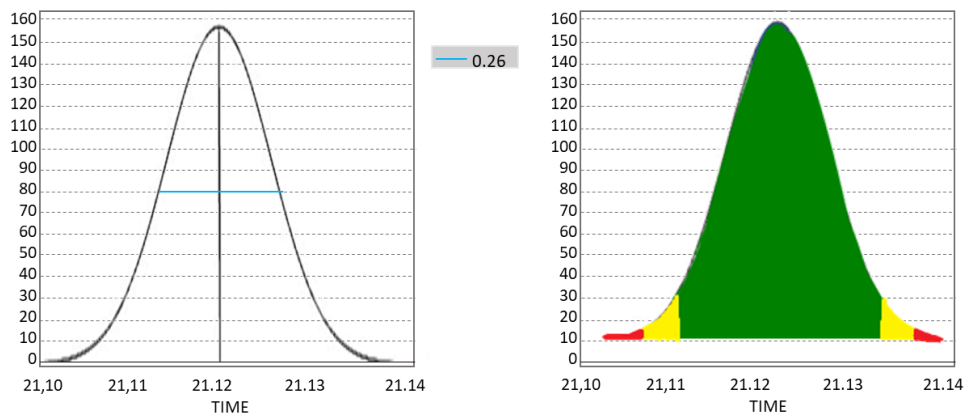


Figura 33: Análise da pureza do padrão de catequina. A área verde corresponde à área pura.

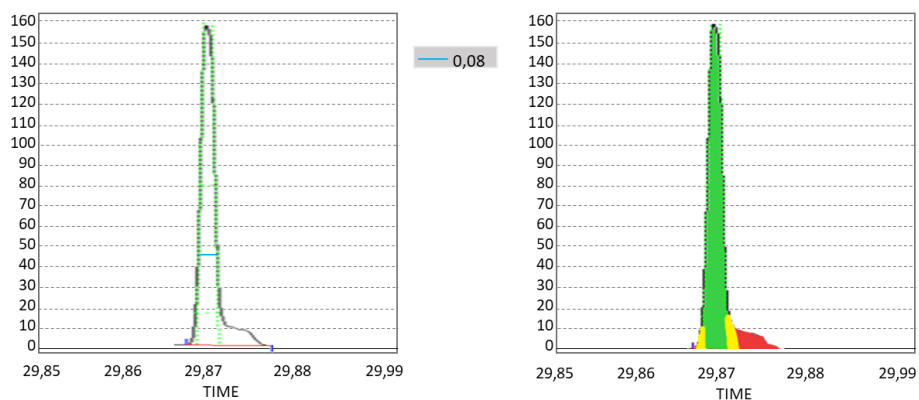


Figura 34: Análise da pureza do padrão de ácido clorogênico. A área verde corresponde à área pura.

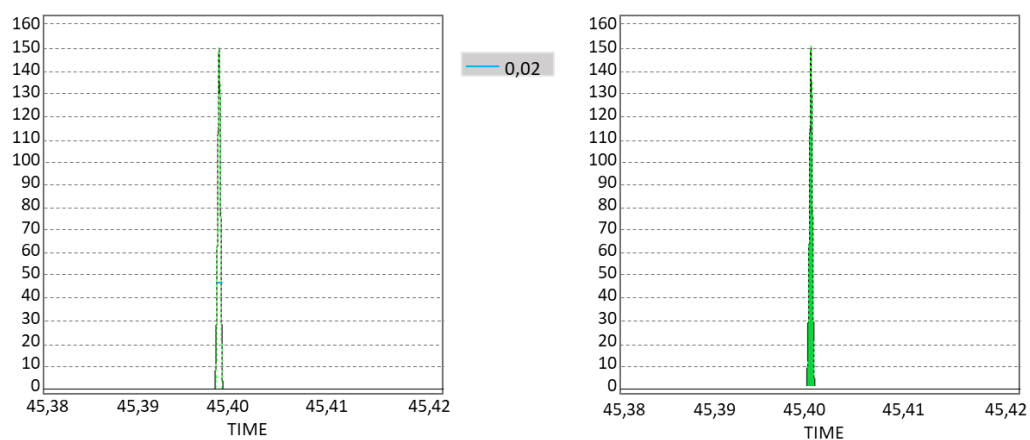


Figura 35: Análise da pureza do padrão de epicatequina. A área verde corresponde à área pura.

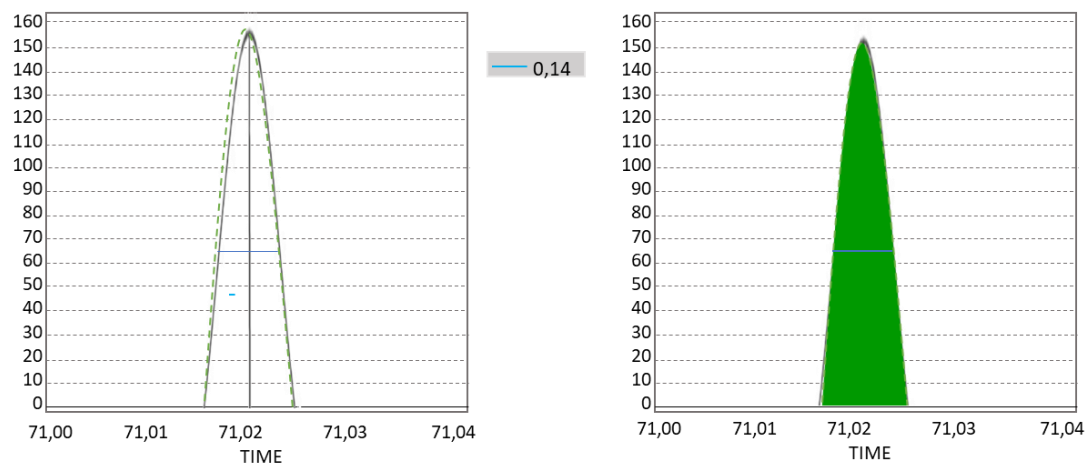


Figura 36: Análise da pureza do padrão de quercetina. A área verde corresponde à área pura.

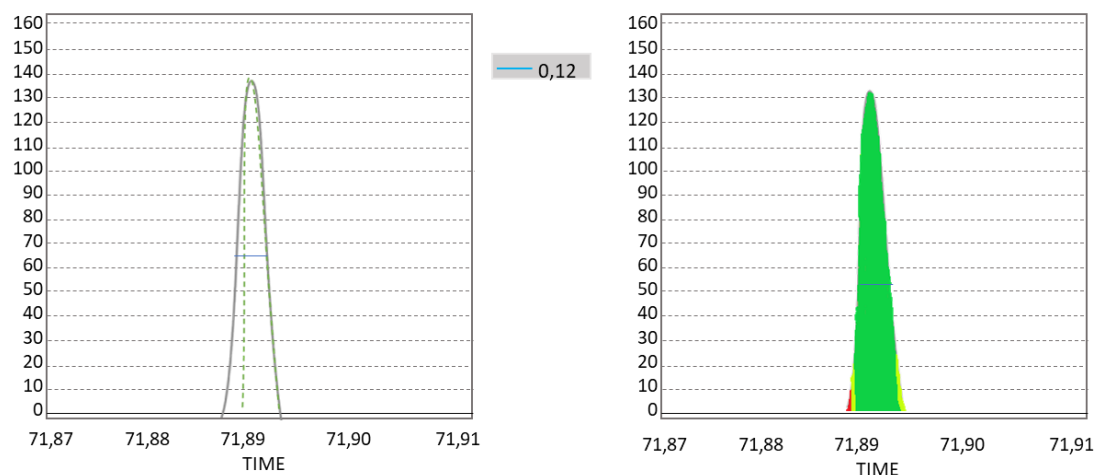


Figura 37: Análise da pureza do padrão de rutina. A área verde corresponde à área pura.

5.2.2.2 Adição dos marcadores

A adição de marcadores na amostra de *S. terebinthifolius* foi realizada para confirmar os picos referentes ao ácido Gálico, Catequina, Ácido Clorogênico, Epicatequina, Rutina e Quercetina. A Figura 38 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *S. terebinthifolius* na diluição 3:10 (v/v), adicionado aos padrões e na Figura 39 e Figura 40 a análise dos marcadores comparando ao cromatograma de *S. terebinthifolius*.

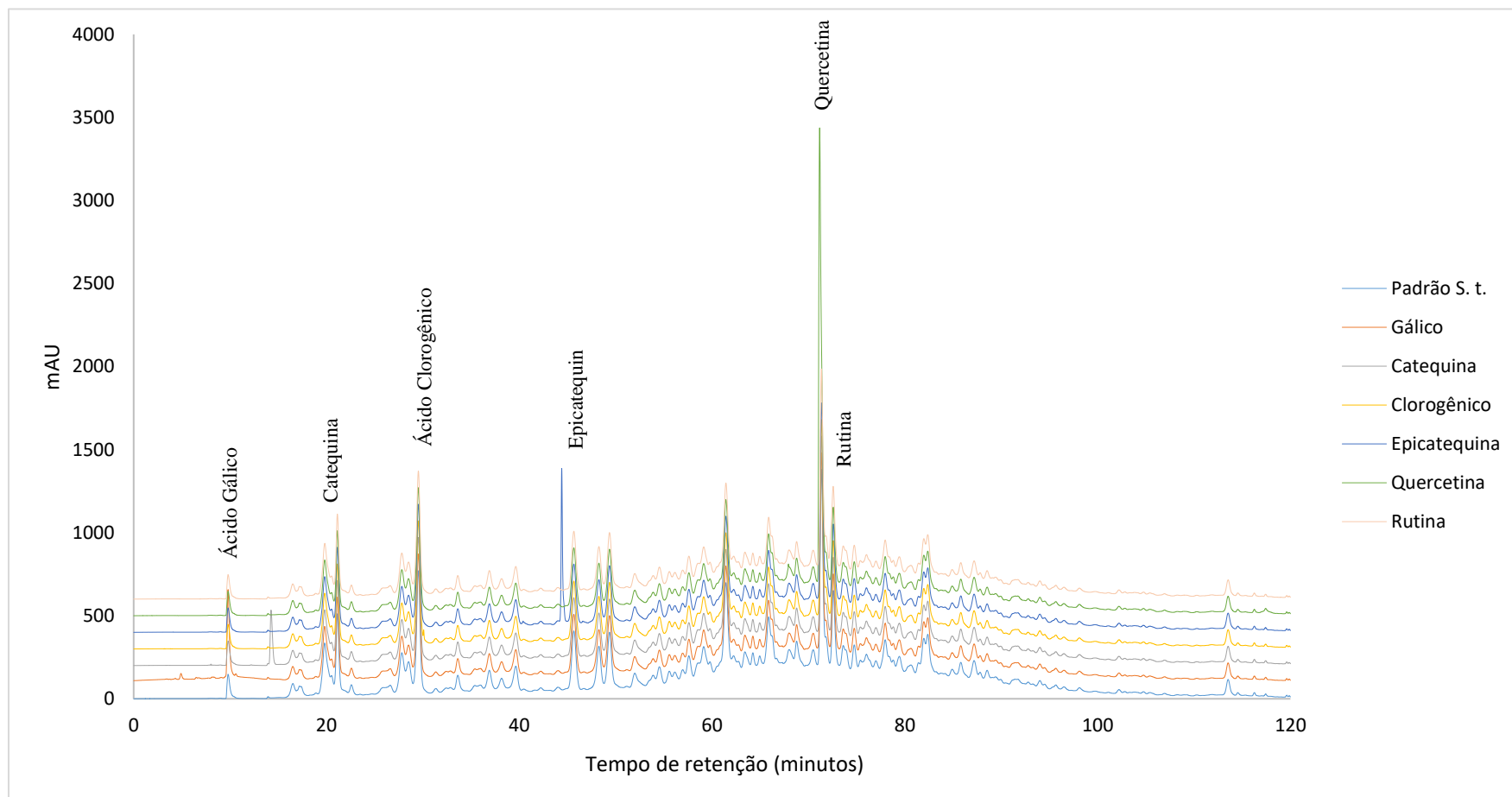


Figura 38: Cromatograma de *S. terebinthifolius* juntamente com a adição dos marcadores químicos padrões.

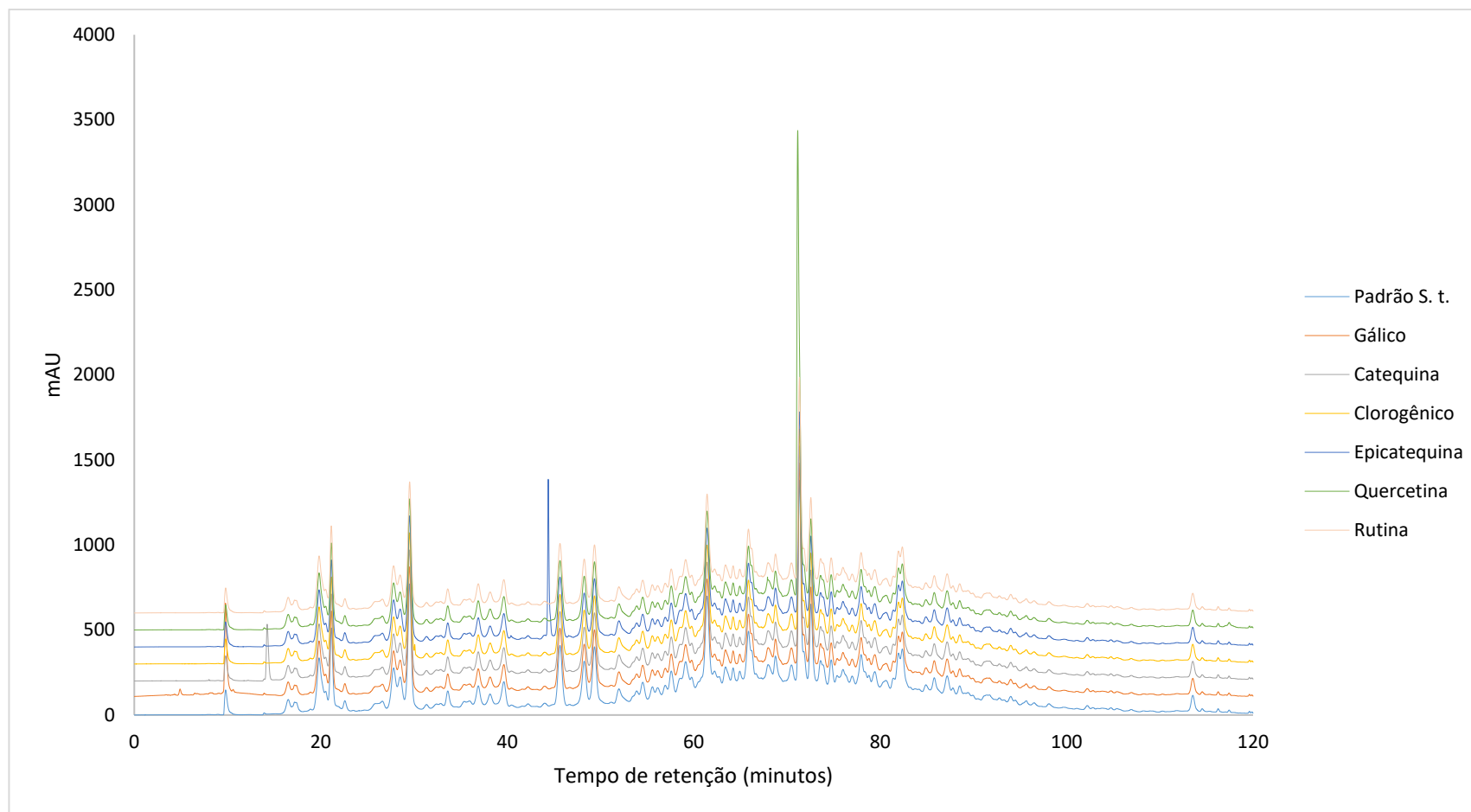


Figura 39 – Cromatogramas de *S. terebinthifolius* com adição de padrões como marcadores químicos: Espécime identificada (azul escuro), ácido gálico (Laranja), catequina (cinza), ácido clorogênico (amarelo), epicatequina (azul claro), quercetina (verde) e Rutina (rosa).

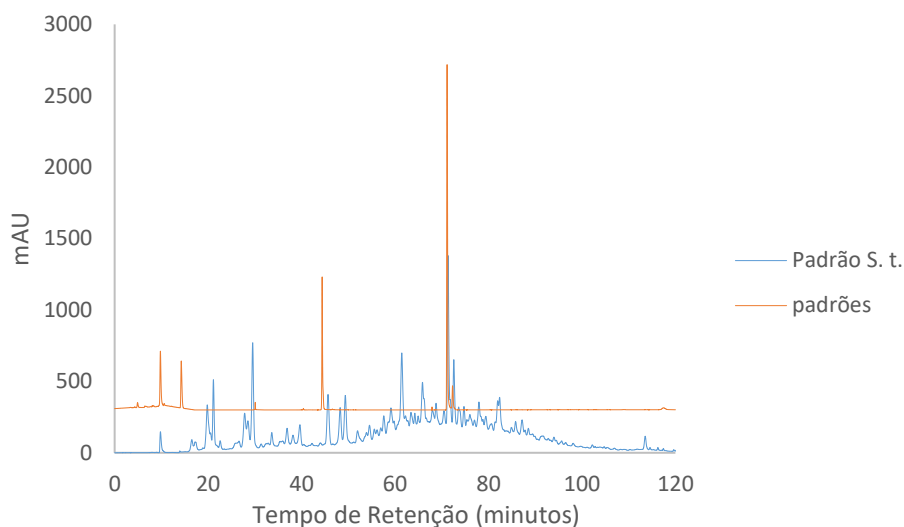


Figura 40: Cromatogramas: marcadores químicos (laranja); *S. terebinthifolius* (azul).

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra antes do preparo. Tal método é trabalhoso, entretanto é especialmente importante quando a amostra é complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando há dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (MOREAU, 2008).

A partir da análise das Figuras 38 e 39, pode-se notar que a adição dos padrões ocasionou um incremento nos picos das substâncias analisadas de *S. terebinthifolius*. Tal fato é fundamental para a confirmação de identidade.

5.2.2.3 Robustez

Na robustez foi avaliado a interferência ao método quando a temperatura de forno de coluna, fluxo de fase móvel ou quando o fabricante da coluna é modificado. O aumento da temperatura do forno da coluna diminui o tempo de retenção, aumenta a eficiência da coluna, aumentando o número de pratos teóricos, contudo aumenta o fator de cauda, diminuindo a simetria, aumentando a possibilidade de erros na quantificação, dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 03: Avaliação da interferência da temperatura de forno de coluna no método.

	Ácido gálico				Catequina				Ácido Clorogênico			
°C	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T
34	10,13	4378,30	2475,40	1,68	22,02	2459,78	3542,12	1,89	30,03	2479,08	3432,34	1,77
35	9,97	4393,97	2584,13	1,80	21,12	2489,54	3578,98	1,76	29,87	2489,55	3458,76	1,35
36	9,76	4378,97	2654,55	1,84	20,89	2460,31	3632,15	1,93	29,66	2444,91	3468,13	1,63
	Epicatequina				Quercetina				Rutina			
°C	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T
34	46,34	3578,23	3987,34	1,77	71,98	3270,77	5881,20	1,99	72,04	1956,34	1567,76	1,64
35	45,40	3693,97	3879,23	1,96	71,02	3299,40	5948,72	1,65	71,89	1989,83	1578,45	1,79
36	45,32	3458,66	3881,57	1,80	70,95	3301,27	5978,39	1,56	71,67	1943,12	1547,98	1,65

t_R = Tempo de retenção, N = Número de pratos teóricos, T = Fator de cauda.

5.2.2.4 Linearidade e intervalo

A linearidade corresponde à capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse dentro de uma determinada variação (GREEN, 1996). Normalmente está relacionada com a variação da inclinação da reta de regressão e é determinada através da curva de calibração. A linearidade da curva é frequentemente expressa pelo coeficiente de correlação (R) ou coeficiente de determinação (R^2), calculado através do método matemático conhecido como regressão linear, através do qual também podem ser calculados os coeficientes de regressão a e b. O método da regressão linear utiliza a relação matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e concentrações conhecidas da espécie de interesse. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva de calibração ($y = a + bx$).

O valor de R permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Recomenda-se que a curva de calibração seja realizada através da análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (CRMESC, 1999).

5.2.2.4.1 Linearidade do ácido gálico

A Tabela 4 mostra o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de ácido gálico que, por regressão linear, obteve $R^2 = 0,999$. Esta faixa de linearidade foi adequada à aplicação do método na determinação do teor de ácido gálico nas amostras do medicamento fitoterápico e das plantas comercializadas em feiras livre. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 41 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 4: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de ácido gálico.

Concentração (mg/mL)	Área
0	0
0,01	2493,4
0,02	2833,9
0,04	5642,7
0,06	7985,3
0,08	10345,2
0,10	13783,8
0,15	20764,5
0,20	27971,6
0,50	65802,9
1,00	140759,2

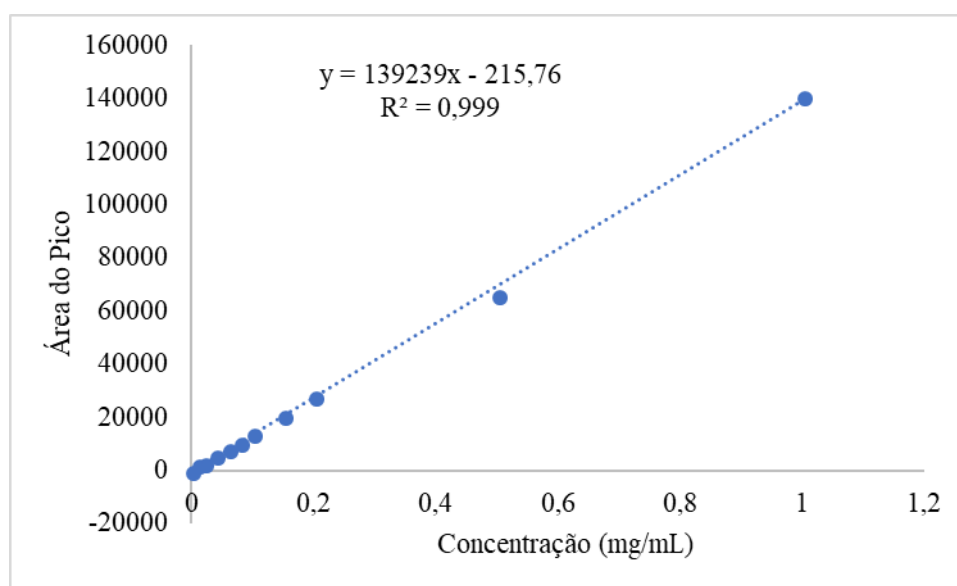


Figura 41: Representação gráfica da curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 139239x - 215,76$, $R^2 = 0,999$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.4.2 Linearidade da Catequina

A Tabela 5 apresenta o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de Catequina. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 42 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 5: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de Catequina.

Concentração (mg/mL)	Área
0	0
0,01	3,0968
0,02	6,1205
0,04	12,356
0,06	19,436
0,08	26,735
0,1	30,027
0,15	60,456
0,20	86,802
0,50	155,157
1,00	310,285

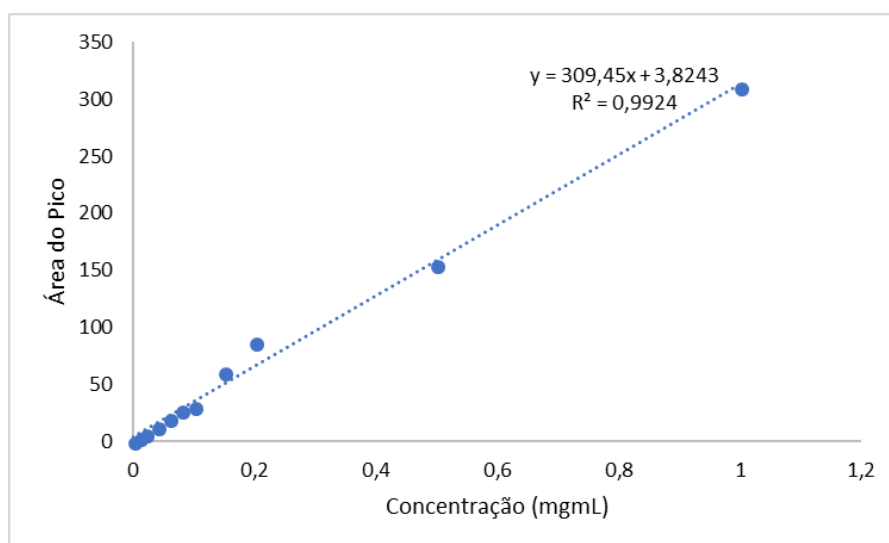


Figura 42: Representação gráfica da curva padrão de Catequina, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 309,45x + 3,8243$, $R^2 = 0,9924$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.4.3 Linearidade do Ácido Clorogênico

A Tabela 6 apresenta o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de ácido clorogênico. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 43 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 6: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de ácido clorogênico.

Concentração (mg/mL)	Área
0,00	0,0000
0,01	0,587
0,02	1,024
0,04	2,139
0,06	3,872
0,08	5,914
0,10	8,974
0,15	19,0350
0,20	27,9670
0,50	51,4730
1,00	108,5470

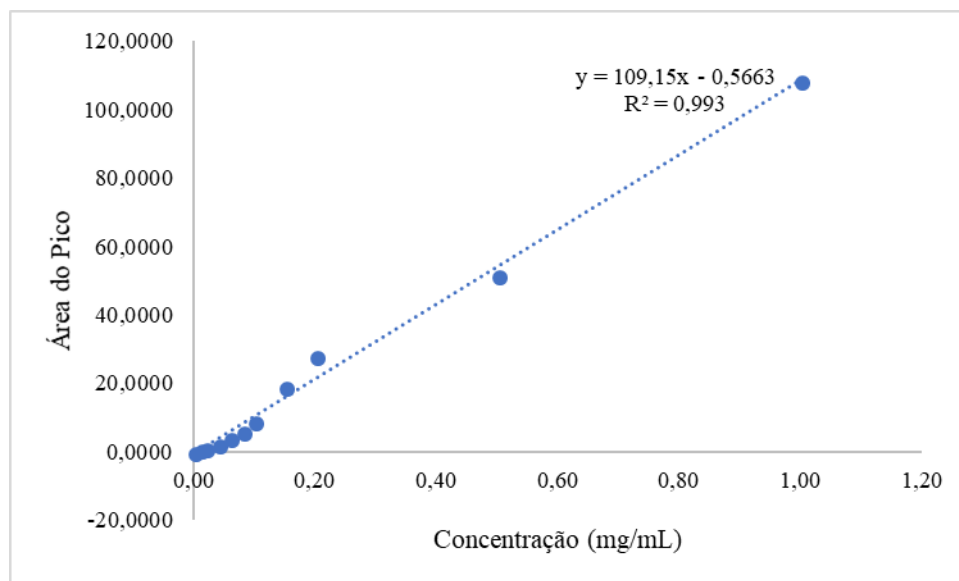


Figura 43: Representação gráfica da curva padrão de ácido clorogênico, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 109,15x - 0,5663$, $R^2 = 0,993$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.4.4 Linearidade da Epicatequina

A Tabela 7 apresenta o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de Epicatequina. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 44 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 7: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de Epicatequina.

Concentração (mg/mL)	Área
0,00	0
0,01	0,312
0,02	0,674
0,04	1,344
0,06	2,756
0,08	4,579
0,10	6,691
0,15	14,234
0,20	24,595
0,50	53,126
1,00	96,645

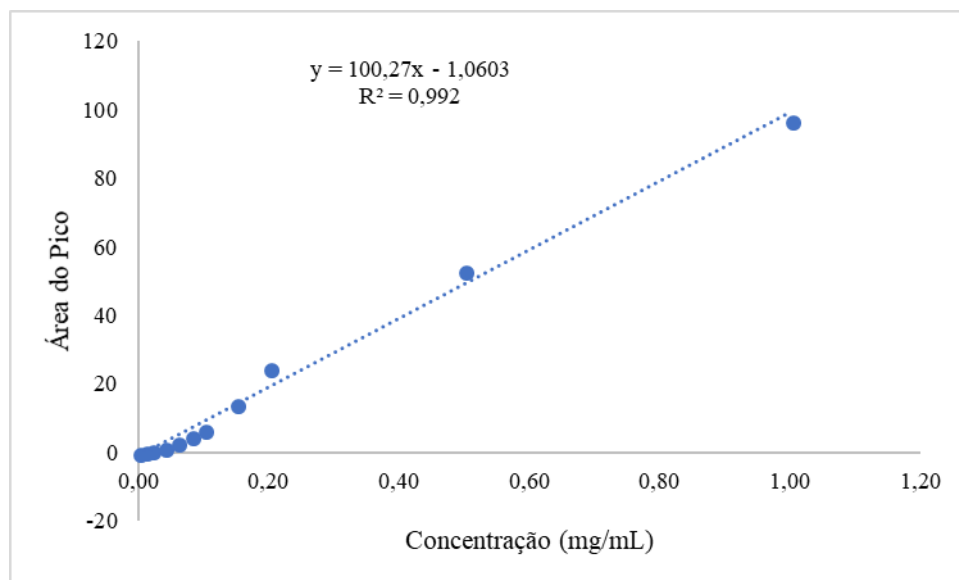


Figura 44: Representação gráfica da curva padrão de Epicatequina, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 100,27x - 1,0603$, $R^2 = 0,992$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou

seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.4.5 Linearidade da Quercetina

A Tabela 8 apresenta o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de quercetina. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 45 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 8: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de Quercetina.

Concentração (mg/mL)	Área
0,00	-
0,01	532896,3468
0,02	689324,7677
0,04	753194,0507
0,06	875490,4568
0,08	956743,1027
0,10	1024763,9769
0,15	1538768,0368
0,20	1976350,2385
0,50	3453211,9867
1,00	6853044,9530

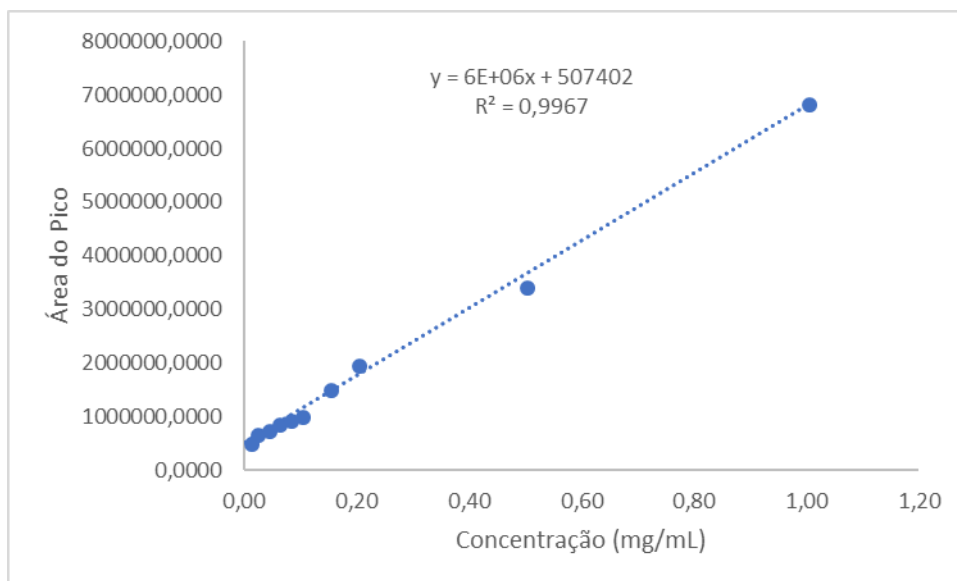


Figura 45: Representação gráfica da curva padrão de Quercetina, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 6,0 \times 10^6x + 507402$, $R^2 = 0,9967$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.4.6 Linearidade da Rutina

A Tabela 9 apresenta o resultado obtido da curva de calibração da solução padrão de Rutina. A curva padrão para o método foi construída a partir das 10 (dez) concentrações analisadas. A Figura 46 representa a curva padrão obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 9: Áreas dos picos cromatográficos da curva de calibração da solução padrão de Catequina.

Concentração (mg/mL)	Área
0,00	0
0,01	3,017
0,02	3,751
0,04	4,237
0,06	4,946
0,08	5,629
0,10	7,42
0,15	9,763
0,20	12,430
0,50	22,579
1,00	45,004

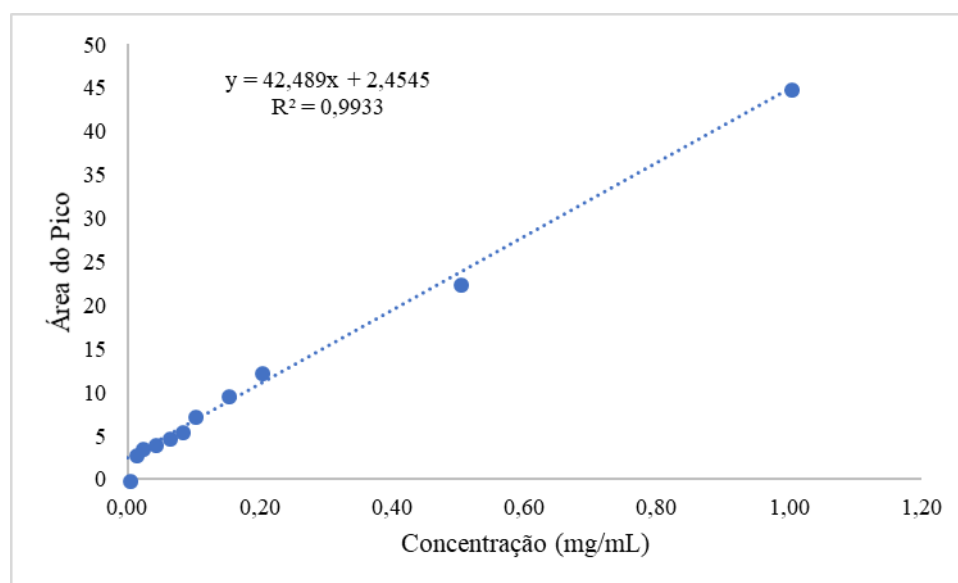


Figura 46: Representação gráfica da curva padrão de Rutina, nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹.

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a determinação de ácido gálico ($y = 42,489x + 2,4545$, $R^2 = 0,9933$) indica a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração do padrão analisado, ou

seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

5.2.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação são os fatores mais críticos em métodos cuja finalidade é a análise de elementos em pequenas quantidades. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada com certo grau de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental (IUPAC). É matematicamente definido como três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de várias determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva de calibração, de acordo com a seguinte equação:

$$LD = \frac{3S_{Br}}{b}$$

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificado com certo grau de confiabilidade, utilizando uma marcha analítica específica (FAO, 1998). O LQ engloba uma relação entre a concentração, precisão e exatidão. É definido matematicamente como dez vezes o desvio padrão do valor sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de várias determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva de calibração, conforme equação abaixo:

$$LQ = \frac{10S_{Br}}{b}$$

Para a determinação do limite de quantificação e detecção para a análise dos analitos em estudo foram realizadas dez leituras do branco. A Tabela 10 apresenta os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os padrões utilizados para *S. terebinthifolius*.

Tabela 10: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *S. terebinthifolius*.

Padrão	LD	LQ
Ácido gálico	0,20	0,61
Catequina	0,11	0,33
Ácido clorogênico	0,12	0,36
Epicatequina	3,24	9,82
Quercetina	0,86	2,61
Rutina	2,17	6,58

5.2.2.6 Precisão

A precisão (repetibilidade ou reprodutibilidade) mede o grau de incerteza de um método analítico surgido devido à dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos (BACCAN e ANDRADE, 2001). A repetibilidade indica a concordância dos resultados obtidos pelo mesmo método sob as mesmas condições (operador, equipamento, laboratório etc.) em um curto período. Da mesma forma, a reprodutibilidade indica a concordância de resultados individuais obtidos em diferentes condições (WELZ e SPERLING, 1999).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo admitidos valores superiores a 15% (BRASIL, 2002; ICH, 2005). O desvio padrão relativo é calculado pela razão entre desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) e a média dessas medidas (X_c), geralmente em porcentagem, conforme equação a seguir:

$$RSD\% = \left(\frac{S_c}{X_c} \right) \cdot 100$$

A precisão pode sofrer variações caso as réplicas sejam realizadas em diferentes laboratórios ou no mesmo laboratório, porém em diferentes períodos (WELZ e SPERLING, 1999).

5.2.2.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução padrão, executada por um mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período, conforme apresentado na Tabela 11

Tabela 11: Dados de repetibilidade para os marcadores de *S. terebinthifolius*.

	Ácido Gálico	Catequina	Ácido Clorogênico	Epicatequina	Quercetina	Rutina
1	139454,76	313,27	108,58	99,21	6507402,00	44,94
2	139473,25	314,98	109,23	99,98	6507503,74	44,03
3	139463,97	313,02	108,01	98,46	6507498,37	44,67
4	139521,04	312,45	109,98	98,67	6505779,48	45,34
5	139287,98	314,34	108,87	99,83	6506687,33	45,45
6	139402,77	314,04	108,60	99,02	6507479,12	45,03
Média	139433,96	313,68	108,87	99,19	6507058,34	44,91
DPR (%)	0,06	0,30	0,62	0,62	0,01	1,15

Todos os resultados estão dentro do que é especificado pela resolução de validação na solução padrão ($DPR \leq 5\%$).

5.2.2.6.2 Precisão intermediária

A precisão verificada para os padrões de *S. terebinthifolius* no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12: Precisão intra-dia do método para quantificação dos marcadores de *S. terebinthifolius* por HPLC.

	C_T (ppm)	Ácido Gálico	C_E (ppm)	Catequina	C_E (ppm)	Ácido Clorogênico	C_E (ppm)	Epicatequina	C_E (ppm)	Quercetina	C_E (ppm)	Rutina	C_E (ppm)
1	1,00	139454,76	1,003	313,27	1,002	108,58	1,000	99,2097	1,003	6507402	1,0003	44,9435	1,002
2	1,00	139473,25	1,003	314,98	1,006	109,23	1,006	99,98	1,008	6507503,74	1,0001	44,03	0,979
3	1,00	139463,97	1,003	313,02	0,999	108,01	0,995	98,46	0,993	6507498,37	1,0002	44,67	0,994
4	1,00	139521,04	1,004	312,45	0,997	109,98	1,013	98,67	0,995	6505779,48	0,9997	45,34	1,009
5	1,00	139287,98	1,002	314,34	1,003	108,87	1,003	99,83	1,006	6506687,33	0,9999	45,45	1,012
6	1,00	139402,77	1,003	314,04	1,002	108,6	1,000	99,02	0,998	6507479,12	1,0000	45,03	1,002
Média			1,003		1,001		1,003		1,000		1,000		0,999
DP			0,001		0,003		0,006		0,006		0,000		0,012
CV (%)			0,06		0,30		0,61		0,61		0,01		1,21

Tabela 13: Precisão inter-dia do método para quantificação dos marcadores de *S. terebinthifolius* por HPLC.

N	Ácido Gálico		Catequina		Ácido Clorogênico		Epicatequina		Quercetina		Rutina	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	139654,76	138637,38	313,27	294,57	108,58	99,77	99,21	94,55	6507402,00	6284464,20	44,94	37,71
2	139373,25	138354,27	314,98	297,16	109,23	98,31	99,98	94,02	6507503,74	6271796,25	44,03	38,44
3	139463,97	138555,12	313,02	292,71	108,01	99,13	98,46	93,90	6507498,37	6275878,65	44,67	37,46
4	139521,04	138719,74	312,45	291,51	109,98	101,59	98,67	94,68	6505779,48	6278446,80	45,34	37,20
5	139287,98	138595,25	314,34	294,23	108,87	98,52	99,83	95,37	6506687,33	6267959,10	45,45	37,26
6	139402,77	139023,61	314,04	296,06	108,60	99,28	99,02	94,54	6507479,12	6273124,65	45,03	37,86
Média	139450,63	138647,56	313,68	294,37	108,88	54,59	99,19	94,51	6507058,34	6275278,28	44,91	37,66
DP	127,70	220,92	0,93	2,08	0,67	1,18	0,61	0,52	701,47	5746,55	0,51	0,46
CV (%)	0,09	0,16	0,30	0,71	0,62	2,17	0,62	0,55	0,01	0,09	1,15	1,22

N = numero de análises realizadas; Valores expressos em área do pico.

Calculando a porcentagem média das médias da concentração (97,34 %) e a média do coeficiente de variação, CV, (0,64) é possível verificar que a precisão intermediária é 3,01 %, valor este, baixo para uma matriz tão complexa quanto os fitoterápicos.

5.2.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa (80 %), média (100 %) e alta (120 %), com 3 (três) réplicas cada. Os resultados encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados obtidos na avaliação da exatidão para os marcadores de *S. terebinthifolius*.

	Ácido Gálico			Catequina			Ácido Clorogênico		
	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado
80%	139454,76	143805,75	103,12	313,27	309,42	98,77	108,58	109,61	100,95
	139473,25	141495,61	101,45	314,98	312,90	99,34	109,23	109,66	100,40
	139463,97	143466,59	102,87	313,02	320,38	102,35	108,01	110,83	102,61
100%	173741,11	172976,65	99,56	390,30	395,10	101,23	135,28	135,81	100,40
	172369,41	174679,16	101,34	389,27	390,79	100,39	134,99	136,16	100,87
	175147,22	174954,56	99,89	393,11	395,00	100,48	135,65	135,90	100,19
120%	216457,10	221522,19	102,34	486,25	485,28	99,80	168,54	170,34	101,07
	213024,46	214451,72	100,67	481,08	480,99	99,98	166,83	167,37	100,33
	219960,39	223633,73	101,67	493,69	493,34	99,93	170,35	171,71	100,80
Recuperação			101,43			100,25			100,84
DP			1,24			1,05			0,73
DPR (%)			1,22			1,05			0,73
	Quercetina			Epicatequina			Rutina		
	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado	Padrão	Amostra	Encontrado % do esperado
80%	6507402,00	6568896,95	100,95	99,21	101,23	102,03	44,94	45,37	100,95
	6507503,74	6533208,38	100,40	99,98	100,90	100,92	44,03	44,20	100,40
	6507498,37	6677344,08	102,61	98,46	101,16	102,74	44,67	45,84	102,61
100%	8107311,86	8139335,74	100,40	123,60	123,57	99,98	55,99	56,21	100,40
	7977288,53	8046292,08	100,87	123,56	124,92	101,10	54,41	54,89	100,87
	8172506,90	8187626,04	100,19	123,65	123,70	100,04	56,10	56,20	100,19
120%	10100575,55	10208651,71	101,07	153,99	156,62	101,71	69,76	70,51	101,07
	9779038,92	9810820,80	100,33	152,70	153,46	100,50	67,25	67,47	100,33
	10263524,52	10345632,72	100,80	155,29	157,21	101,24	70,45	71,02	100,80
Recuperação			100,84			101,14			100,84
DP			0,73			0,92			0,73
DPR (%)			0,73			0,91			0,73

Após validação verificou-se que o método apresenta especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

5.2.3 Desenvolvimento de marcadores de identidade

Embora o método apresente aplicabilidade na rotina para o controle de qualidade dos produtos intermediários, alguma dificuldade pode ser vislumbrada no que tange a ausência de um marcador típico que permita o controle de qualidade de cada um dos macerados no produto acabado. Problema típico para produtos multidrogas e agravado pela inclusão em sua formulação de espécies, cujos empregos terapêuticos tradicionais estão associados à mesma classe de metabólitos secundários.

A análise comparativa do cromatograma da Figura 47 revela um pico importante com tempo de retenção de aproximadamente 61 minutos.

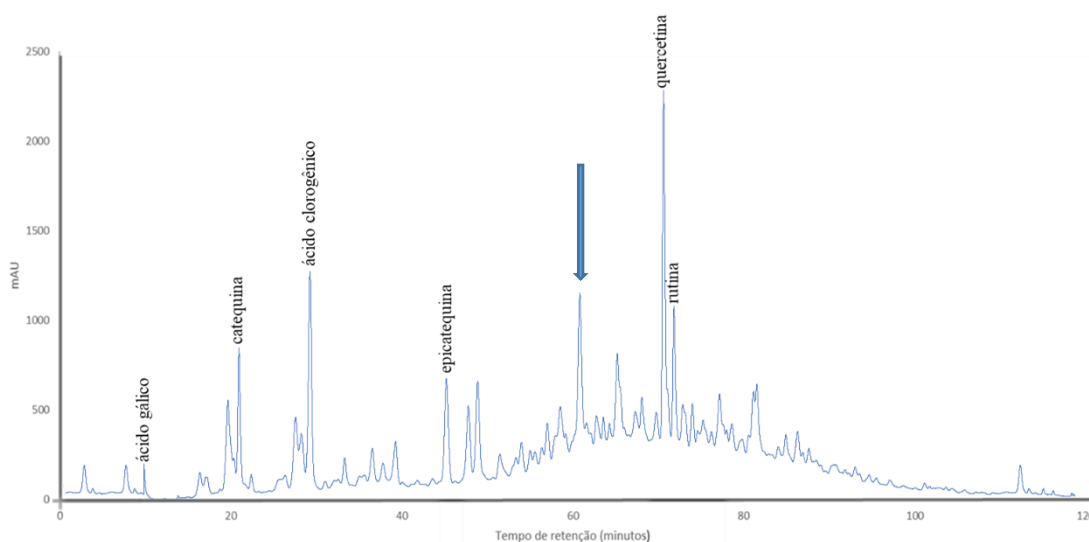


Figura 47: Cromatograma obtido em 210 nm para a solução extrativa de *S. terebinthifolius*.

Estudos ainda são necessários para confirmação da estrutura desta substância e sua utilização como marcador específico. Na Figura 48 o espectro de UV do pico em questão.

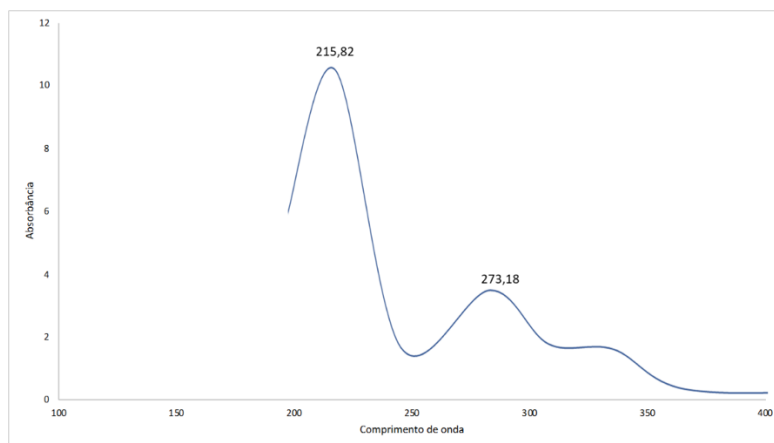


Figura 48: Espectro de UV do pico com TR de 61 minutos, detectado em 210, e, presente no macerado de *S. terebinthifolius*

5.2.4 Espectrofotometria UV-VIS

Os espectros das substâncias epicatequina, ácido gálico, quercetina, rutina, catequina e ácido clorogênico, foram obtidos em espectrofotômetro modelo Varian modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa de 200-800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1.0 cm e capacidade de 3 mL

Os espectros foram salvos como Comma-separated values (CSV) e exportados para o software OriginPro 8® para posterior análise de componentes principais.

A escolha da região de trabalho foi norteada pela inspeção dos espectros obtidos e informações da literatura referentes às bandas características no espectro dos compostos utilizados como marcadores químicos. A ocorrência de bandas fortes na região abaixo de 220 nm pode ser atribuída à absorção dos ácidos clorogênicos. De fato, a exemplo das enonas (cetonas a,b-insaturadas), esses compostos contêm em sua molécula o cromóforo C=C (em conjugação com o grupo C=O) que é responsável por uma absorção intensa, tipicamente entre 215-250 nm (SILVERSTEIN, 1994), associada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Por conseguinte, a faixa de comprimentos de onda entre 220 e 350 nm foi então escolhida para o tratamento quimiométrico dos dados.

Ao se observar os perfis espectrais das 6 amostras de *S. terebinthifolius* analisadas com adição do marcador químico, percebeu-se que os espectros obtidos na região compreendida entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm trazem informações

relevantes acerca das análises (Figura 49a-f), dos marcadores, uma vez que esta é a faixa de absorção de tais amostras.

A análise dos espectros não apresentou problemas de variação sistemática da linha de base nem variações aleatórias associadas a ruídos nos dados. Sendo assim, não houve necessidade da realização de nenhum pré-processamento (correção de linha base, suavização, etc.) aplicado às amostras analisadas.

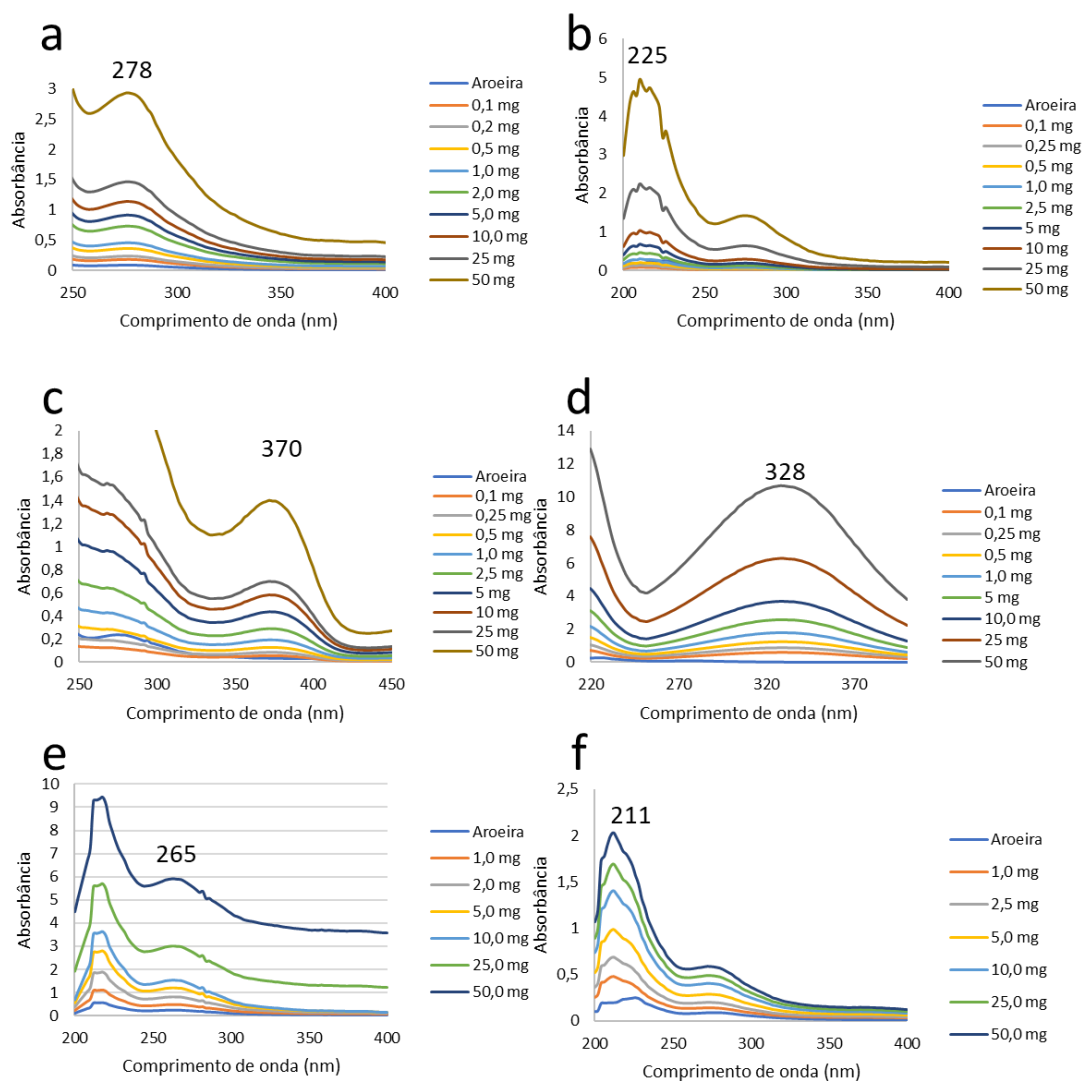


Figura 49: Espectros ultravioleta das amostras de *S. terebinthifolius* com adição de padrão interno na região de 200 a 400 nm. Em (a): Epicatequina, (b): ácido gálico, (c): Quercetina, (d): ácido clorogênico, (e): catequina e (f): Rutina.

Observa-se que a adição de soluções de concentrações conhecidas dos marcadores utilizados incrementa o espectro no comprimento de onda característico de cada marcador

químico. A adição de marcador interno é de suma importância quando se trabalha com matrizes complexas. Dessa forma, a Figura 50 apresenta as curvas analíticas obtidas por UV-Vis e a Tabela 15 apresenta os coeficientes da curva analítica ($y = mx + b$), bem como o coeficiente de correlação, r^2 .

As curvas analíticas, mostradas na Figura 50, foram utilizadas para quantificação dos compostos presentes tanto nas amostras de *S. terebinthifolius* comercializados no estado da Bahia quanto amostras de fitoterápicos.

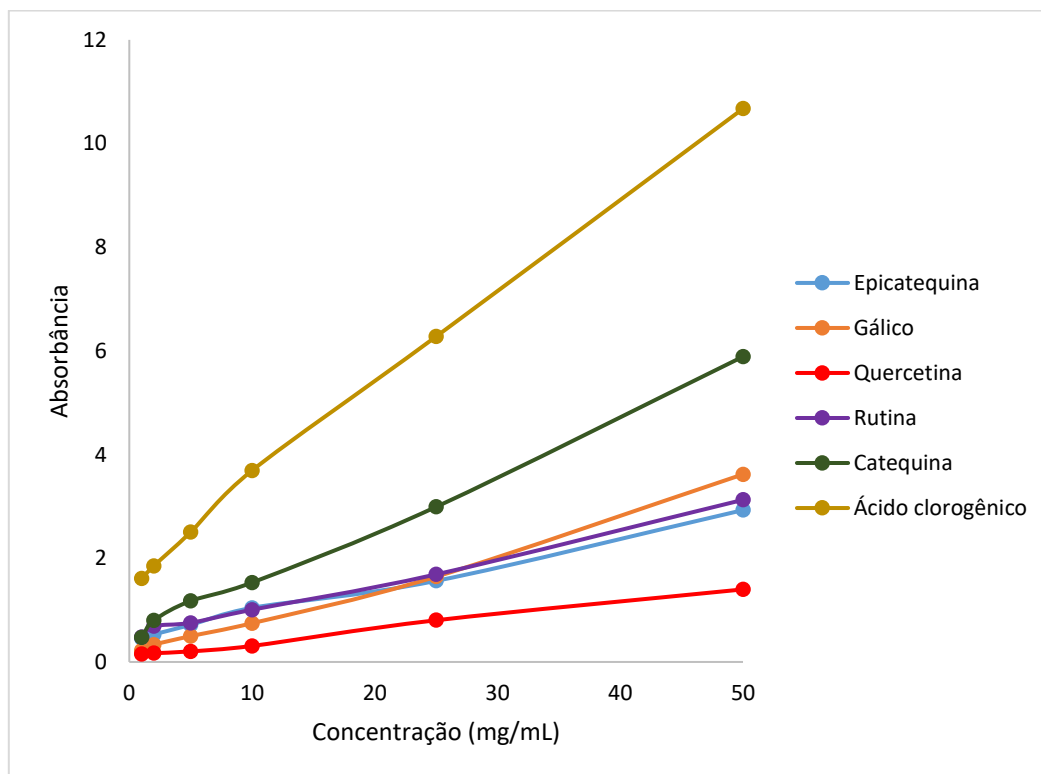


Figura 50: Curvas analíticas dos padrões de *S. terebinthifolius* obtidos por UV-vis com padronização interna.

A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade, uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações dos padrões presentes nas soluções, mostrando valores de coeficientes de correlação (r^2) próximos a 1.

Aplicada a regressão linear dos mínimos quadrados nas curvas analíticas, foi possível obter a equação da reta para cada analito. A Tabela 15 apresenta os valores, de "r", que indicam o coeficiente de correlação, "m" a sensibilidade e "b" a interseção da reta.

Tabela 15: Valores obtidos de "m", " b " e "r" através da regressão linear da curva analítica.

Composto	m	b	R²
Epicatequina	0,046	0,4478	0,994
Gálico	0,0681	0,1223	0,9939
Quercetina	0,0262	0,0999	0,9943
Rutina	0,0519	0,4872	0,9951
Catequina	0,1061	0,4934	0,9961
Ácido clorogênico	0,1825	1,6302	0,9979

Estes resultados indicam que a linearidade está dentro do intervalo de concentração testada para os padrões. A correlação dos dados observados na Tabela 15, apresentou um coeficiente de correlação superior a 0,98 para todas as substâncias padrões estudadas.

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório. A Tabela 16 sumariza os resultados das análises.

Tabela 16: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *S. terebinthifolius* coletadas no estado da Bahia. St (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso e nas amostras de fitoterápicos.

Amostra	Concentração (mg.g ⁻¹)					
	Ácido Gálico	Catequina	Ácido Clorogênico	Epicatequina	Quercetina	Rutina
Padrão	3,234±0,015	5,831±0,654	6,593±0,855	3,274±0,059	6,745±0,831	2,075±0,884
St 1	3,315±0,245	6,530±0,039	6,200±0,449	3,240±0,068	6,432±0,063	2,400±0,150
St 2	3,600±0,224	6,456±0,706	6,238±0,031	3,273±0,549	6,848±0,181	3,912±0,677
St 3	3,619±0,155	6,567±1,021	6,255±0,796	3,289±0,168	6,690±0,071	2,418±0,098
St 4	3,627±0,898	6,474±0,001	6,190±0,385	3,231±0,034	6,930±0,020	2,396±0,795
St 5	3,595±1,925	6,50±0,041	6,195±0,447	3,235±0,871	6,729±0,057	2,398±0,482
St 6	3,597±1,235	6,479±0,023	6,216±0,744	3,254±0,966	6,788±0,187	2,405±0,058
St 7	3,608±0,372	6,523±0,507	7,461±0,096	4,384±0,327	6,739±0,189	2,820±0,036
St 8	4,230±0,048	7,723±0,185	7,569±0,411	4,515±0,137	6,834±0,006	4,556±0,070
St 9	4,284±0,055	6,631±0,022	6,375±0,565	3,399±0,287	5,425±0,188	2,458±0,521
St 10	3,687±0,125	6,530±0,039	6,245±0,953	3,281±0,441	7,068±0,045	2,415±0,317
Amostra 1	3,245±0,015	5,715±0,026	6,151±0,019	3,581±0,256	6,147±0,015	2,450±0,176
Amostra 2	4,587±0,198	5,026±0,049	6,474±0,023	3,609±0,365	6,568±0,012	2,472±0,016
Amostra 3	2,897±0,003	5,034±0,096	6,546±0,009	3,586±0,088	6,479±0,133	3,072±0,152

* St = *Schinus terebinthifolius*

5.2.5 Aplicação da metodologia proposta.

Para aplicação da metodologia proposta, a Figura 51 apresenta os resultados obtidos para as análises de *S. terebinthifolius* comercializados em feiras livres do estado da Bahia. A análise da Figura 51 permite observar que há diferenças na concentração dos metabólitos entre as amostras estudadas (Tabela 17), bem como diferenças nos espectros, principalmente nas amostras St 5 e St 8, comercializadas em Guanambi e Euclides da Cunha, respectivamente. De fato, tais diferenças nas concentrações podem ser advindas da diferença de bioma a que a espécie vegetal está submetida, uma vez que fatores abióticos influenciam, significativamente, na concentração dos metabólitos (EWANS, 1994; CALIXTO, 2000). O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000). O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade (EWANS, 1994; CALIXTO, 2000).

O método desenvolvido nesse trabalho foi aplicado para verificar, quantificar e prever a presença de metabólitos secundários na espécime estudada, uma vez que o teor total e as proporções relativas de metabólitos secundários nas plantas podem variar devido a muitos fatores, como temperatura, luminosidade, altitude, pluviometria, radiação UV, condições de nutrientes, sazonalidade, ritmo circadiano, etc. (YUNES e CALIXTO, 2001; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Variações sazonais na bioquímica podem ser influenciadas pela mudança padrões de alocação de recursos, que refletem diferentes demandas fisiológicas associadas ao crescimento, defesa e reprodução (KRISCHIK e DENNO, 1983; WILKENS *et al.*, 1996; HERMS e MATTSON, 1992). Por outro lado, os cromatogramas das amostras St 5 - *Schinus terebinthifolius* coletado no ponto 5 (vermelho) e St 8 - *Schinus terebinthifolius* coletado no ponto 8 (marrom) mostraram-se diverso do cromatograma padrão (preto). Tal fator pode ser ocasionado por contaminação das amostras através de adulteração, uma vez que elas são comercializadas fragmentadas. Há ampla evidência da produção e venda de extratos vegetais adulterados no mercado internacional. Por exemplo, em 2003, uma investigação sobre a qualidade de nove extratos de *Ginkgo biloba* comercializado na Europa, Ásia e América do Norte encontrou

uma amostra com conteúdo elevado de rutina, um flavonol glicosídeo que ocorre em muitas espécies de plantas, e uma amostra com quase nenhum terpeno de lactonas e sem flavonóis. Os autores sugeriram que a rutina pura foi adicionada a uma amostra para aumentar o conteúdo de flavonóis totais. Da mesma forma, quatro dos 14 produtos de *ginkgo* comercializados na área de Edmonton, Alberta (Canadá) apresentaram adulteração com incremento de flavonóis puros (rutina, quercetina, kaempferol e isorhamnetin) (LIU *et al.*, 2005). Além disso, uma comparação dos cromatogramas (*fingerprint*) de dezenove extratos de *ginkgo* comercializados em Jiangsu e Províncias de Zhejiang, na China, através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) evidenciaram que três produtos estavam adulterados com rutina exógena (XIE *et al.*, 2006). A presença de desvios exorbitantes nas concentrações de quercetina, kaempferol e isoramnetina são de fato devido à adição de flavonóis sintéticos aos extratos vegetais, como sugerido por Liu *et al.*, 2000.

Ma e colaboradores (2006) avaliaram a autenticidade de extratos padronizados de folha e produtos comerciais acabados de *ginkgo*. Os extratos, em pó, foram recebidos de vários fornecedores canadenses e amostras comerciais foram comprado em farmácias locais no Canadá. Baseado na comparação das impressões digitais (*fingerprint*) determinadas por HPLC-UV com os de amostras autênticas, a ocorrência de adulteração foi confirmada em quatro dos 15 extratos padronizados (27%) e 10 de 14 (71%) produtos comerciais.

A metodologia desenvolvida foi aplicada para verificação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no estado da Bahia, bem como os fitoterápicos de *S. terebinthifolius*. Os resultados são mostrados na Figura 51 para amostras comercializadas no estado da Bahia e na Figura 52 para as amostras de fitoterápicos

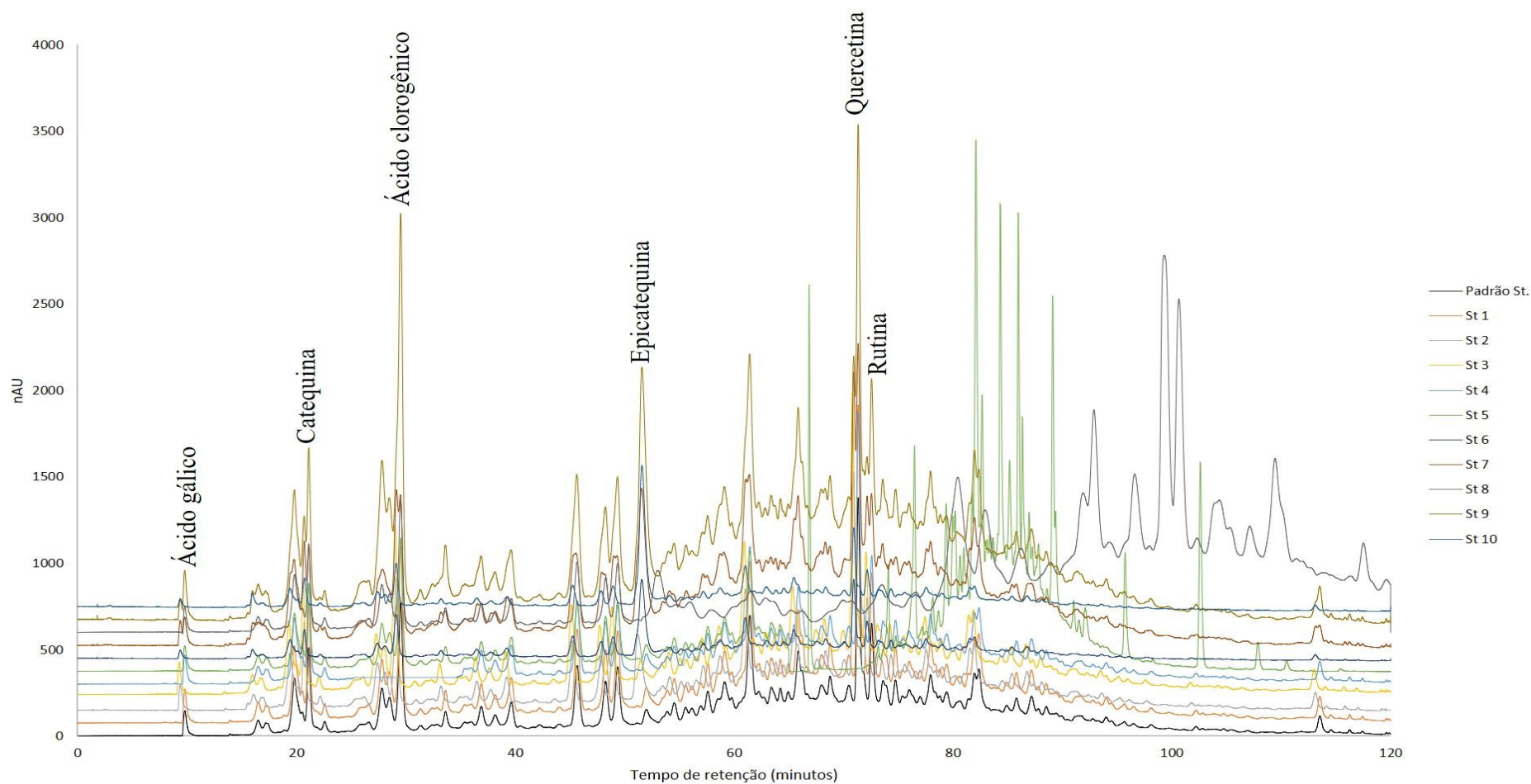


Figura 51: Cromatograma das amostras de *S. terebinthifolius* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

Tabela 17: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *S. terebinthifolius* coletadas no estado da Bahia. St (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

Amostra	Concentração (mg.g ⁻¹)					
	Ácido Gálico	Catequina	Ácido clorogênico	Epicatequina	Quercetina	Rutina
Padrão	3,7854 (27)	5,8761 (46)	6,6792 (27)	3,4903 (48)	6,8732 (53)	2,1458 (84)
St 1	3,4882 (45)	4,8346 (52)	6,7762 (54)	3,6856 (25)	6,5091 (04)	2,8931 (48)
St 2	3,6368 (91)	6,4093 (47)	6,3261(67)	3,8809 (51)	6,3309 (67)	4,3468 (47)
St 3	3,5635 (58)	5,2047 (12)	6,5938 (55)	3,1709 (04)	6,3669 (27)	3,8155 (91)
St 4	3,6744 (73)	5,9384 (66)	6,4600 (30)	4,1960 (08)	6,4683 (40)	3,5796 (94)
St 5	3,5813 (23)	6,0437 (29)	7,2394 (69)	2,9864 (32)	6,4117 (55)	4,8479 (98)
St 6	3,6090 (62)	5,1462 (34)	6,9785 (93)	3,6368 (56)	6,7300 (18)	3,3139 (68)
St 7	3,5863 (85)	5,8316 (54)	5,9312 (22)	4,7587 (54)	6,9362 (36)	2,8660 (54)
St 8	3,6303 (59)	4,2811 (37)	6,4548 (73)	5,8041 (46)	7,5390 (29)	2,1074 (25)
St 9	4,8307 (37)	7,6411 (44)	6,6043 (78)	3,7939 (84)	5,0763 (71)	2,6905 (47)
St 10	3,7386 (74)	5,7207 (29)	6,7543(96)	3,9403 (83)	6,7144 (68)	3,2607 (194)

* St = *Schinus terebinthifolius*

** Os valores entre parenteses, refere-se ao desvio padrão das análises em triplicata.

A Figura 52 apresenta o cromatograma de três amostras industriais de *S. terebinthifolius* comercializadas na cidade de Salvador e a Tabela 18 demonstra a concentração dos marcadores utilizados nesse trabalho.

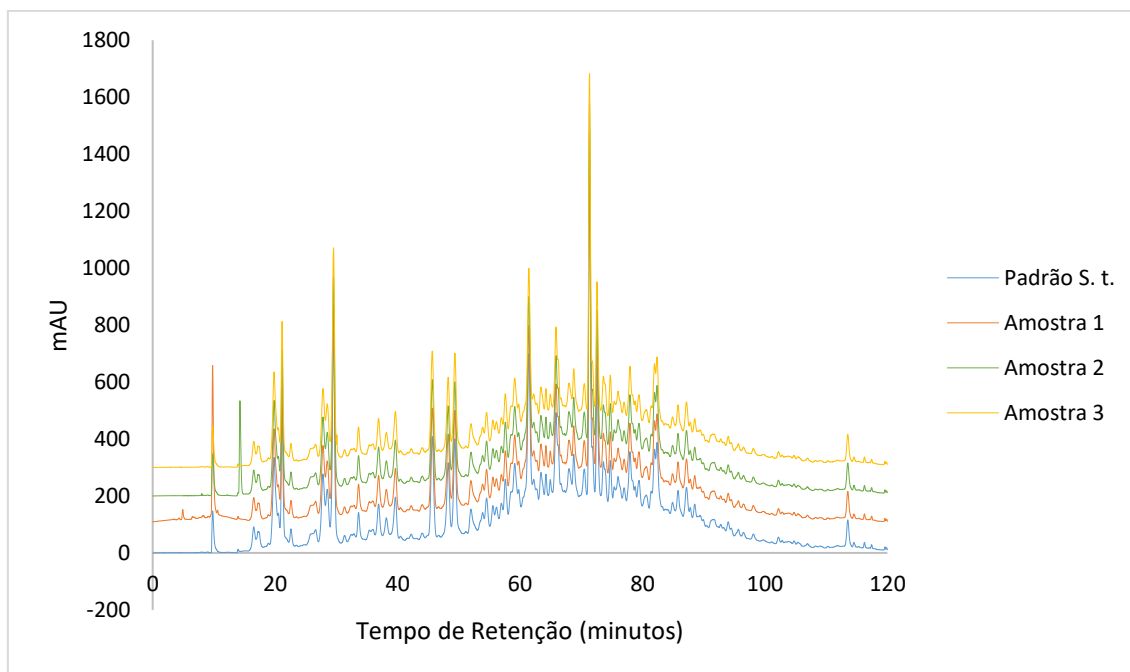


Figura 52: Cromatograma das amostras de *S. terebinthifolius* comerciais utilizadas em Salvador, Bahia

Tabela 18: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *S. terebinthifolius* comerciais utilizadas em Salvador, Bahia.

Marcador	Concentração (mg.g ⁻¹)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Ácido gálico	3,5272±0,023	4,6548±0,012	2,9873±0,045
Catequina	5,7540±0,015	5,1328±0,658	5,2891±0,088
Ácido clorogênico	6,1485±0,012	6,1591±0,028	6,357±0,099
Epicatequina	3,159±0,158	3,567±0,023	3,015±0,002
Quercetina	6,5486±0,009	6,147±0,015	6,5682±0,012
Rutina	2,158±0,015	2,356±0,023	2,599±0,074

5.2.6 Análises Estatísticas

Para a análise multivariada, com a geração do dendograma e os cálculos das componentes principais e secundárias, utilizou-se o software estatístico Origin. Uma das funções, porém, dos métodos multivariados é, ao apresentar os resultados, ser capaz de reduzir a dimensão dos dados tornando possível um melhor entendimento gráfico a duas ou três dimensões. Entre os diversos métodos existentes, os mais utilizados na área de bioenergia são a análise de agrupamentos e a análise das componentes principais (LANDIM, 2010; SANTCHURN *et al.*, 2012).

Na HCA utilizou-se a distância euclidiana como medida de proximidade e o método da ligação média UPGMA como técnica hierárquica aglomerativa, ou seja, a distância entre grupos foi calculada pela distância média entre todos os pares de objetos dos dois diferentes grupos. A qualidade do dendograma obtido foi avaliada por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC), que mede a correlação entre as distâncias recuperadas do dendograma com a matriz de distâncias originais (PROTÁSIO *et al.* 2013a).

Para a PCA utilizou-se apenas a média de cada variável e considerou-se a matriz de correlação dos dados, conforme proposto por Protásio *et al.* (2013b), que afirmam que as componentes principais, obtidas via matriz de covariâncias (grau com que cada variável está linearmente correlacionada com outra), são influenciadas pelas variáveis de maior variância ou pelo efeito da escala dessas variáveis, sendo que esse problema pode ser amenizado se essas componentes forem obtidas por meio da matriz de correlação dos dados originais. Eles afirmam ainda que este procedimento equivale a padronizar as variáveis, pelas respectivas médias e desvios-padrão, permitindo maior precisão na análise. Uma vez determinadas as componentes principais, os seus valores numéricos e as coordenadas de cada variável, denominados de escores, podem ser calculados para cada elemento amostral. Desse modo, os valores de cada componente podem ser analisados, usando-se técnicas de estatísticas usuais como a análise de variância e a análise de regressão, dentre outras (MINGOTI, 2005; SANTCHURN, 2012).

O número de componentes principais consideradas e interpretadas foi determinado pelo gráfico denominado *screenplot*, onde na abscissa encontram-se as componentes principais e na ordenada os autovalores, que representam a variância estimada para cada componente principal.

5.2.6.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (HCA - Hierarchical Clustering Agglomerative) é uma técnica de análise multivariada cuja finalidade principal é agregar as variáveis com base nas características e nas relações entre elas. A classificação é realizada de modo que cada variável seja semelhante a outra no agrupamento com base em um conjunto de características escolhidas. Assim, se a classificação for bem-sucedida, os objetos dentro dos agrupamentos estarão próximos quando representados graficamente, e diferentes agrupamentos estarão distantes (HAIR *et al.*, 2009; LANDIM, 2010; MINGOTI, 2005; RUHOFF *et al.*, 2009). Esses autores ressaltam que esta técnica multivariada não estima a variável estatística empiricamente, mas em vez disso, usa a variável como especificada pelo pesquisador e isso torna a definição da variável estatística um passo crítico na análise, porque pode comprometer todos os resultados posteriores.

A análise de agrupamentos pode ser usada com dois objetivos: (a) simplificação de dados, porque a habilidade de analisar grupos de observações semelhantes é maior do que as observações individuais; e (b) identificação de relação por meio da estrutura simplificada da análise de agrupamentos, que retrata vínculo entre as variáveis não reveladas de outra forma (LANDIM, 2010; SANTCHURN *et al.*, 2012).

Na prática, as variáveis das amostras serão divididas em grupos de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si em relação às características que nelas foram avaliadas. Além disso, espera-se que os elementos de grupos diferentes sejam heterogêneos (ou dissimilares) em relação a essas mesmas características (HAIR *et al.*, 2009; PROTÁSIO *et al.*, 2013b).

De acordo com Hair *et al.* (2009), a medida de similaridade é fundamental na análise de agrupamentos, pois é um indicador empírico de correspondência e de semelhança entre as variáveis. A mais utilizada é a da distância, que representa similaridade como proximidade de observações umas com as outras. Nesse caso, a distância é convertida em uma medida de similaridade pelo uso de uma relação inversa, ou seja, valores maiores denotam menor similaridade e vice-versa. Embora esta proximidade possa parecer um conceito simples, diversas medidas de distância estão disponíveis, cada uma com características específicas, tais como, distância euclidiana, distância city-block, distância de Chebychev, distância de Mahalanobis, entre outras.

A distância euclidiana é mais comumente utilizada para medir a similaridade ou dissimilaridade entre duas amostras. Essencialmente, é uma medida do comprimento de um segmento de reta desenhado entre dois objetos, quando representados graficamente (HAIR *et al.*, 2009; LANDIM, 2010; MINGOTI, 2005; SANTCHURN *et al.*, 2012; RUHOFF *et al.*, 2009).

Os procedimentos hierárquicos de agrupamentos (tipo árvore) são os tipos de estruturas mais utilizadas e podem ser aglomerativos ou divisivos. Nos aglomerativos, utiliza-se o dendograma que é um tipo específico de diagrama que organiza determinadas variáveis depois de uma análise estatística de dados. Emprega-se um método quantitativo, que leva a agrupamentos e a sua ordenação hierárquica ascendente, que em termos gráficos se assemelha aos ramos de uma árvore, que se dividem em outros sucessivamente. Nele estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade, que agruparam pares de amostras (COUTO *et al.*, 2013; GENOTYPES, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2014; LANDIM, 2010; PEDREIRA *et al.*, 2003; PROTÁSIO *et al.*, 2013b,).

A escala vertical de um dendograma indica o nível de similaridade (Figura 53), assim quanto mais elevado este indicador, mais heterogênea são as partes agrupadas. No eixo horizontal, são marcados os agrupamentos em uma ordem conveniente. No deslocamento para a direita, no diagrama de árvore, aumenta-se as distâncias de conexão e agrupamentos cada vez maiores são formados, com cada vez mais diversidades intra-grupamentos. Se este gráfico mostra um platô claro, isto significa que muitos Clusters se formaram, aproximadamente, à mesma distância de conexão (LANDIM, 2010; MINGOTI, 2005; SANTCHURN *et al.*, 2012).

O algoritmo de agrupamento em um procedimento hierárquico determina como a similaridade é definida entre agrupamentos de múltiplos membros, ou seja, é a forma de medir a distância entre as variáveis nos agrupamentos. Entre numerosas metodologias, apresentadas por Hair *et al.* (2009), os métodos de aglomeração mais populares são: ligação individual simples, ligação completa, ligação média (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), método centroide e método de Ward. O método de ligação média (UPGMA) utiliza a média das distâncias entre todos os pares de amostras de um agrupamento e do outro para a formação de cada grupo. É um método de agrupamento não-ponderado, que utiliza médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterizá-las por valores extremos (máximo e mínimo), por isso, muitos pesquisadores consideram-no o mais apropriado para inúmeras aplicações,

inclusive em bioenergia (COUTO *et al.*, 2013; GENOTYPES, 2006; HAIR *et al.*, 2009; PROTÁSIO *et al.*, 2013b; SANTCHURN *et al.*, 2012).

Afinal, entre tantos métodos e algoritmos para o cálculo da HCA, Vicini e Souza (2005) demonstraram que um método é melhor que outro quando o dendograma fornece uma imagem menos distorcida da realidade. Pode-se avaliar o grau de deformação provocado pela construção do dendograma por meio do coeficiente de correlação cofenético (ccc), que pode medir o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento proposto por Sokal e Rohlf (2013).

Hair *et al.* (2009) disseram que o coeficiente cofenético (ccc) é uma medida direta de heterogeneidade na qual os maiores valores indicam a solução de agrupamento final. Ele é calculado com os índices de similaridade da matriz original e os índices reconstituídos com base no dendograma. Logo, quanto maior for o coeficiente cofenético, menor será a distorção. Sokal e Rohlf (2013) consideram os ajustes do coeficiente de correlação cofenético bom quando o mesmo apresentar valores $\geq 0,8$. Estes resultados indicam que houve um bom ajuste entre as matrizes originais de distâncias e as distâncias da matriz cofenética, ou seja, quanto mais próximo de 1, menor a distorção provocada ao agrupar os objetos.

A análise de agrupamentos pode ser usada em muitas áreas do conhecimento: na economia, em pesquisa de mercado, na identificação do posicionamento de produtos em relação aos concorrentes e na segmentação de clientes de acordo com perfis de consumo (BERRY e LINO, 2000; MINGOTI, 2005); em ecologia, na classificação de espécies (McGARIGAL *et al.*, 2000); em ergonomia, na seleção de assentos para uso em determinadas atividades (WERNER *et al.*, 2003); em biologia, na investigação das semelhanças e diferenças entre as partes de girassol (KÖTSCHAU *et al.*, 2014); em agronomia, na organização das espécies em grupos de similaridade, a partir de características reprodutivas, vegetativas e agronômicas (TOTTI *et al.*, 2001); em bioenergia, na avaliação de diversos resíduos lignocelulósicos para sua produção (PROTÁSIO *et al.*, 2013b) e na seleção de clones de *Eucalyptus* com finalidades energéticas (PROTÁSIO *et al.*, 2013c). Hair *et al.* (2009) complementam que pacotes computacionais e softwares amigáveis trouxeram a HCA para a era do clique, assim, pode-se rapidamente analisar dados complexos com relativa facilidade usando programas como o Origin (2018)

Utilizando o conteúdo de seis metabólitos presentes em 11 amostras de *S. terebinthifolius* como variável de agrupamento, o HCA dos dados padronizados foi realizado com a distância euclidiana e o agrupamento de ligação de Ward pelo software Origin. O dendrograma mostrado na Figura 53 ilustrou claramente que todas as amostras poderiam ser categorizadas em cinco grupos com Grupo 1 (G1) contendo a amostra padrão, St 2, St 4 e St 7, Grupo 2 (G2) contendo St 5 e St 8, Grupo 3 (G3) contendo St 6, Grupo 4 (G4) contendo St9 e Grupo 5 (G5) contendo St 10, respectivamente. Tais diferenças podem estar relacionadas a cultivos diferentes de *S. terebinthifolius* no estado da Bahia, bem como a mistura com outras espécimes de plantas (contaminação?). Todavia, é de grande importância que haja controle rígido no material vegetal bruto a partir da fonte, um bom processo de agricultura e o sistema de avaliação da qualidade, especialmente para ervas que são utilizadas na atenção primária a saúde.

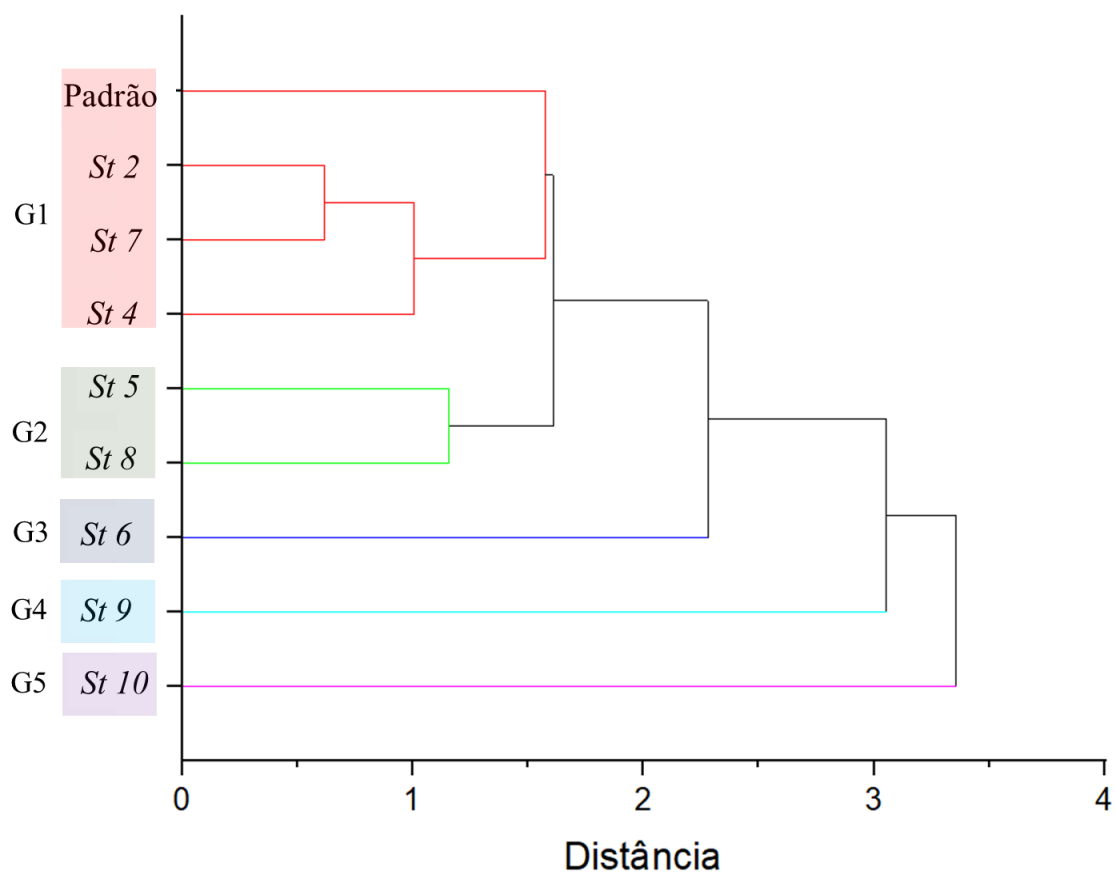


Figura 53: Dendrograma de seis composições químicas para 11 amostras de *S. terebinthifolius*.. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3, G4: grupo 4; G5: Grupo 5

Os resultados mostraram que o HCA pode classificar a similaridade de *Schinus terebinthifolius* com base no conteúdo dos seis componentes. A partir da análise da HCA verifica-se que apenas as amostras St2, St4 e St7 tinha alta qualidade, enquanto que para as demais amostras, não se pode determinar alta qualidade dos resultados. Portanto, a análise de plotagem de radar foi usada na análise de qualidade.

5.2.6.2 Análise de plotagem de radar

Um gráfico de radar foi usado para avaliar a qualidade das amostras de *S. terebinthifolius* por causa de sua discriminação simples, rápida e rotineira. Para facilitar a comparação, o gráfico de radar foi empregado para classificar preliminarmente as amostras de *S. terebinthifolius* com base no conteúdo dos seis componentes. Análises de tramadas de radar foram realizadas em 11 amostras de *S. terebinthifolius*. comercializadas no estado da Bahia.

A Figura 54a mostra as médias dos seis componentes em G1-G5 no HCA. Como mostrado, as distribuições dos seis componentes das amostras *S. terebinthifolius* de vários grupos exibiram padrões característicos diferentes. As amostras do G2 apresentaram um conteúdo distintamente menor de catequina em relação aos seis componentes e foram facilmente discriminadas em comparação com as amostras de *S. terebinthifolius*. dos outros quatro grupos.

Como mostrado na Figura 54b, a distribuição dos padrões de composição química apresentou características semelhantes. Este achado indicou que as amostras de *S. terebinthifolius*. das várias localidades tinham características semelhantes, contudo, há características distintas nas amostras analisadas.

No entanto, a medição visual foi o único resultado recebido pela análise de plotagem de radar, e a falta de indicadores claros descrevendo as distinções exatas reduziu a confiabilidade dos resultados. Portanto, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada nos estudos a seguir.

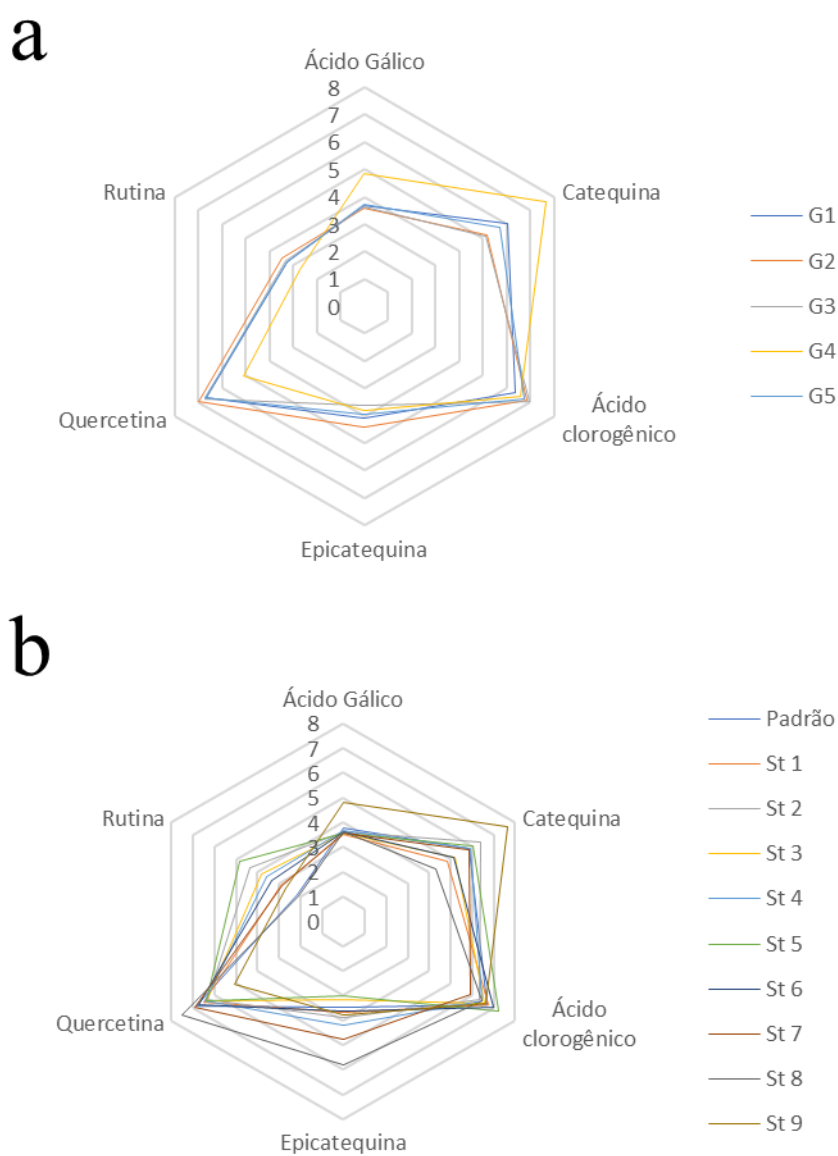


Figura 54: Gráficos de radar mostrando a diferença de origens geográficas em termos de seis componentes em várias amostras de *S. terebinthifolius*; (a) G1, G2, G3, G4 e G5. (b) A distribuição da composição química de 11 amostras de *S. terebinthifolius*.

5.2.6.3 Análise dos componentes principais (PCA)

Para avaliar o teor dos elementos em estudo, a distribuição dos mesmos nas matrizes analisadas, dentre outros aspectos, realizou-se a análise de componentes

principais utilizando o programa Origin. Organizou-se uma matriz (198x6), em cujas linhas e colunas foram dispostas as concentrações de cada replicata e as variáveis (analitos), respectivamente, totalizando 198 valores de concentração referentes a 6 marcadores de interesse.

Os valores dessa matriz de dados foram autoescalados, a fim de padronizar suas ordens de grandeza em um mesmo nível, permitindo a análise estatística dos dados.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 19, observa-se que as duas primeiras componentes principais formadas (PC1 47,64 %; PC2 31,76 %) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas duas componentes juntas permitem explicar 79,40 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

A Figura 55 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os dois primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

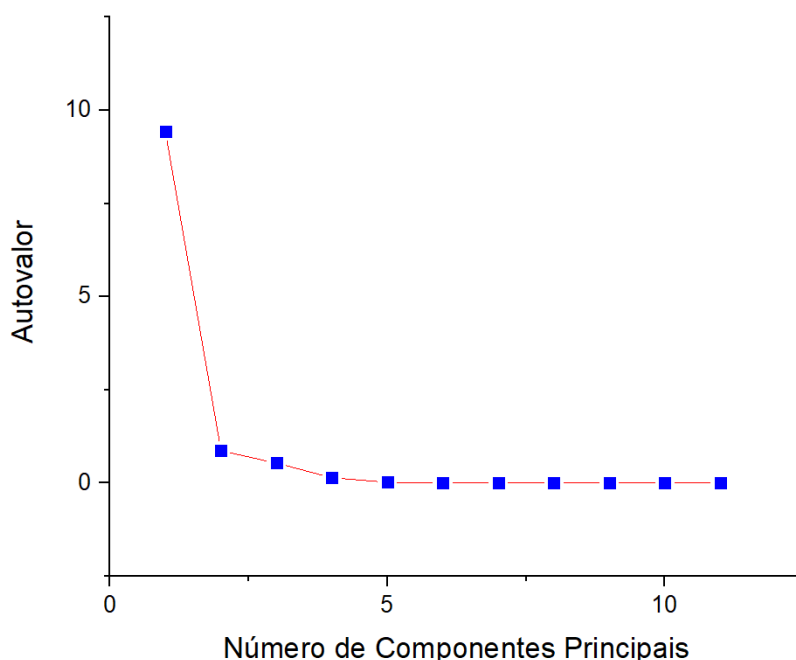


Figura 55: Gráfico de autovalor *versus* número de componentes principais.

Tabela 19: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	2,85828	47.64%	47.64%
2	1,90559	31.76%	79.40%
3	0,79692	13.28%	92.68%
4	0,27876	4.65%	97.33%
5	0,14345	2.39%	99.72%
6	0,01698	0.28%	100.00%

A Tabela 20, abaixo, permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 20: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2
Ácido Gálico	0,41147	0,46703
Catequina	0,51324	0,25307
Ácido clorogênico	0,19391	-0,49785
Epicatequina	-0,40089	0,44915
Quercetina	-0,55956	-0,13046
Rutina	0,23633	-0,50123

Os maiores pesos são observados para as variáveis catequina e quercetina, na primeira componente principal, responsáveis por explicar a maior variância dos resultados nesse fator. Já a variável ácido clorogênico e rutina apresenta maior peso em PC 2. É sabido que a grandeza dos pesos é avaliada assumindo seus valores numéricos em módulo.

5.2.6.3.1 Análise de PC1 x PC2

Obteve-se os gráficos de pesos (Figura 56) e escores (Figura 57) para a análise de PC1 x PC2. A partir da análise da Figura 56, evidencia-se que é possível a separação de epicatequina e quercetina dos demais compostos, enquanto através da componente principal 2, é possível separar os compostos quercetina, rutina e ácido clorogênico dos demais, uma vez que ambos apresentam valores negativos.

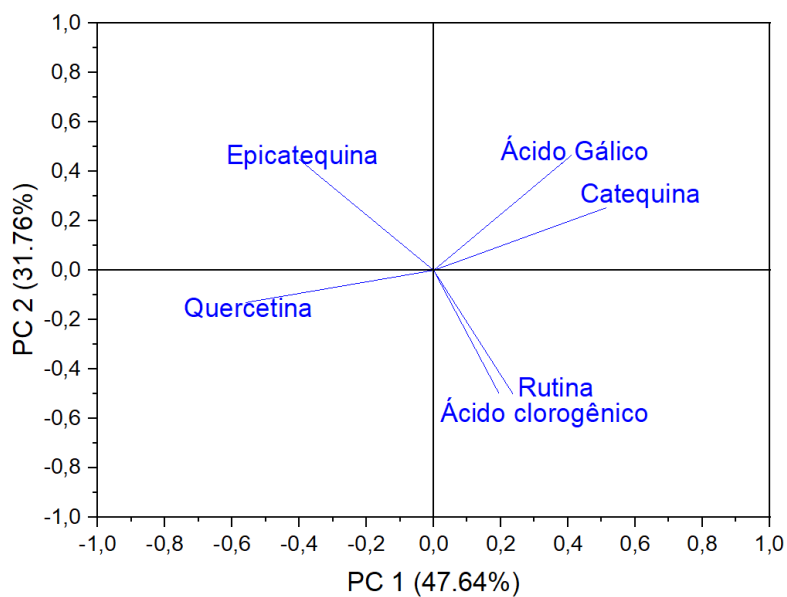


Figura 56: Gráfico de pesos PC1 x PC2

Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, nota-se a formação de quatro grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pelas amostras St7 e St8, um segundo grupo composto pelas amostras St9, um terceiro grupo formado pela amostra padrão, St1, St2, St3, St4, St6, St8 e St10 e um quarto grupo composto pela amostra St5,

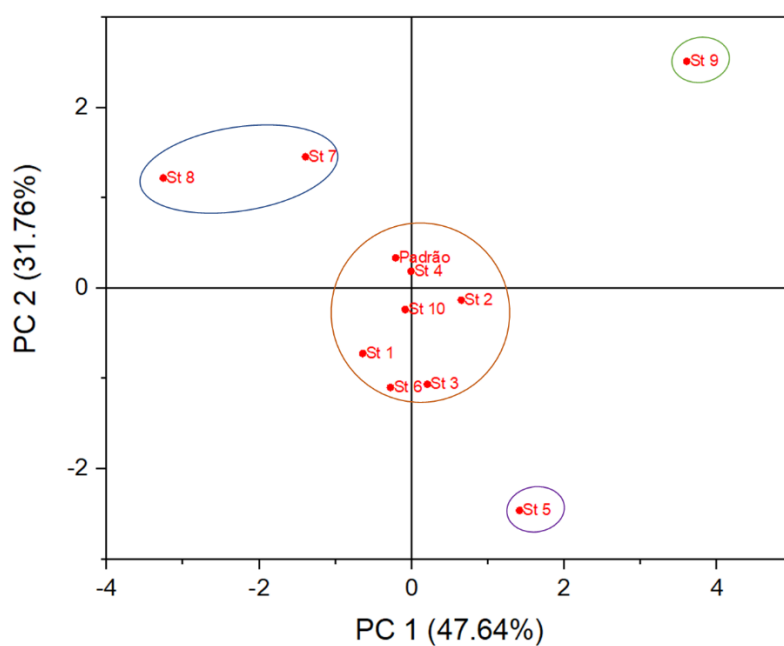


Figura 57: Gráfico de escores PC1 x PC2

Conforme evidenciado na Figura 57, de acordo com PC2, o grupo formado pela amostra St5 apresenta maior concentração de rutina e ácido clorogênico em relação às outras amostras. As amostras St7 e St8 apresentam maior concentração de epicatequina quando comparado às outras amostras. As amostras St9 apresenta a maior concentração de ácido gálico e catequina. Ao centro do gráfico de escores, ainda na Figura 57, o grupo formado pelas demais amostras – amostra padrão, St1, St2, St3, St4, St6, St8 e St10.-exibe menor teor de todos os elementos químicos determinados. De fato, pode-se concluir que as amostras St1, St2, St3, St4, St6, St8 e St10 estão mais relacionadas, em termos de concentração de metabólitos, com a amostra padrão, sendo que a amostra St4 é a que apresenta maior similaridade com o padrão.

5.2.6.3.2 Análise de PCA tridimensional

Além da análise clássica da PCA, é possível a plotagem de gráfico usando três componentes principais e assim possibilitar uma visão tridimensional da dispersão dos pontos, conforme Figura 58. O *software* utilizado permite a plotagem tridimensional e também possibilita a rotação do conjunto de dados do gráfico, sendo possível visualizar a distribuição dos pontos sob diversos ângulos, tornando possível observar a melhor posição onde os pontos de uma amostra de *S. terebinthifolius* encontram-se separados dos pontos de outra amostra. Dessa forma, aumentam as possibilidades de encontrar pontos no espaço que nos permitem verificar a correlação ou a discrepância entre as amostras analisadas.

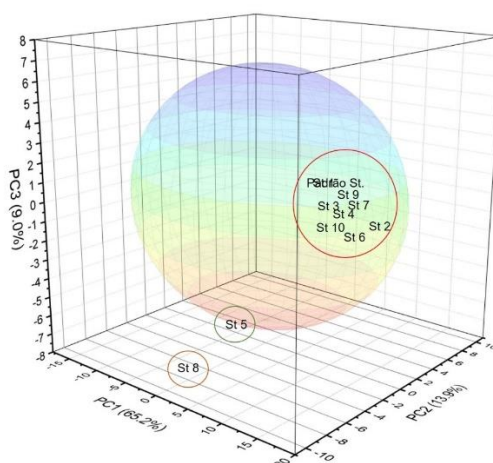


Figura 58: PCA das amostras de *S. terebinthifolius* apresentadas num gráfico tridimensional com a presença de três componentes principais. O círculo central apresenta a confiabilidade de 95%.

5.2.7 Avaliação da metodologia

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos, para a metodologia desenvolvida nesse trabalho, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos da repetibilidade para os métodos propostos, utilizando o Teste *t* de Student e ANOVA (análise de variância), presumindo variâncias equivalentes e comparando-os com os resultados obtidos com a análise por UV-Vis (QUINTELA *et al.*, 2010). Além disso, a comparação também foi realizada através de análise da PCA em ambas metodologias, bem como através de análise por LC-MS.

A análise por LC-MS pode ser verificada no apêndice A. Embora possa haver correspondência entre as análises, discrepâncias foram encontradas devido a utilização de outro equipamento e outra coluna cromatográfica.

Os resultados do teste *t* para as análises realizadas por UV-vis e comparadas com HPLC são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Teste *t* pareado para a determinação dos marcadores químicos de *S. terebinthifolius* por HPLC e por espectrofotometria UV-vis.

	HPLC	UV
Média	4,970004136	4,940434113
Variância	2,32372589	3,042032432
Observações	66	66
Correlação de Pearson	0,982879161	
Hipótese da diferença de média	0	
gol	130	
Stat t	0,103707002	
P(T<=t) uni-caudal	0,458780845	
t crítico uni-caudal	1,656659413	
P(T<=t) bi-caudal	0,03756169	
t crítico bi-caudal	1,978380405	

Pode-se observar que em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada (0,98). Os resultados do Teste *t* de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$ (Tabela 21), demonstraram não haver diferença significativa entre a metodo proposto em comparação a metodo por espectrofotometria UV-Vis.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a quantificação dos marcadores químicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 22

Tabela 22: Análise da variância (ANOVA) das determinações da concentração dos marcadores por HPLC e UV-Vis.

Fonte de variação	gel	SQ	MQ	F	P - Valor	F de significação
Entre grupos	1	0,00216	0,028855	0,010755*	0,04875	3,9139
Dentro dos grupos	130	348,7743	2,682879			
Total	139	348,8031				

* Significativo para $p < 0,05$

O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,04875 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabela 22) demonstrou não haver diferenças significativas entre os métodos ($\rho = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias evidenciam que não há diferenças entre os métodos, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a método proposto é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *S. terebinthifolius*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 23, observa-se que as três primeiras componentes principais formadas (PC1 47,64%; PC2 21,82%, PC3 20,60%) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas três componentes juntas permitem explicar 79,29 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

A Figura 59 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário seleccionar os três primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

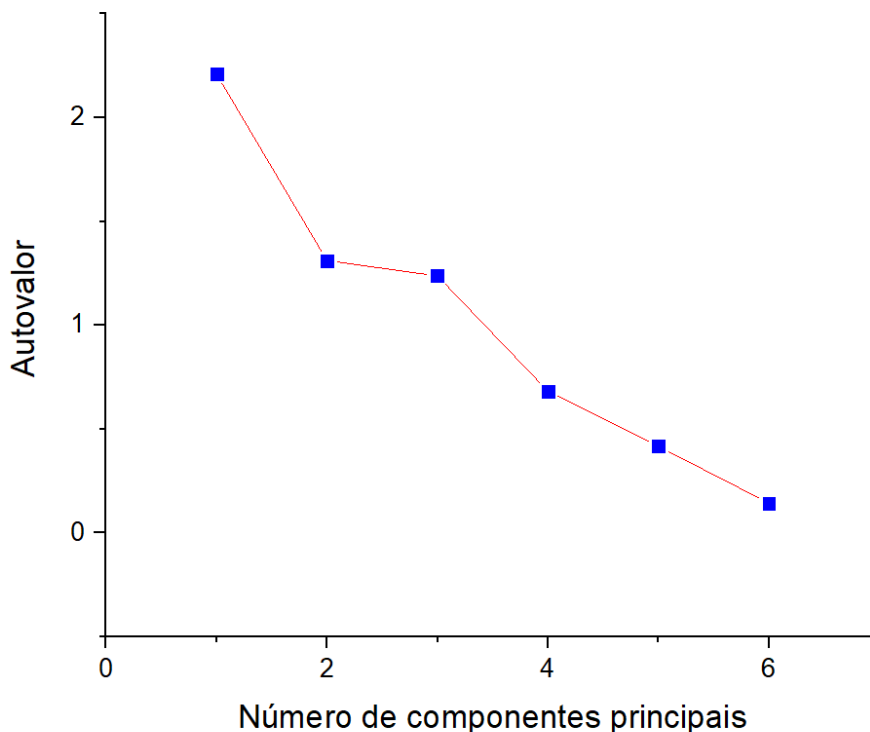


Figura 59: Gráfico de autovalor *versus* número de componentes principais.

Tabela 23: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

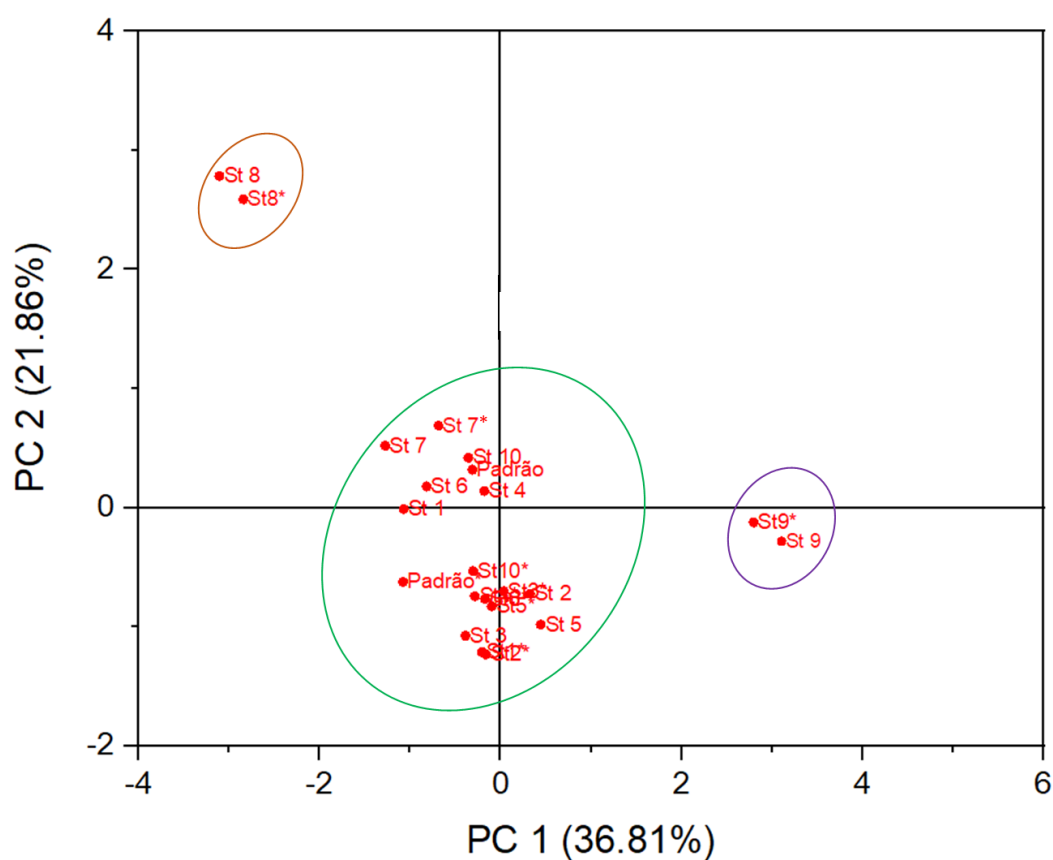
CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	2,20873	36.81%	36.81%
2	1,31136	21.86%	58.67%
3	1,23732	20.62%	79.29%
4	0,68241	11.37%	90.66%
5	0,41662	6.94%	97.61%
6	0,14355	2.39%	100.00%

A Tabela 24 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 24: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2	
Ácido Gálico	0,54332	-0,03292	-0,21271
Catequina	0,12056	0,44398	-0,02326
Ácido clorogênico	-0,19417	0,7544	-0,02326
Epicatequina	-0,577	0,14969	-0,091
Quercetina	0,04581	-0,26828	0,76861
Rutina	0,54332	-0,03292	-0,21271

A partir dos valores encontrados de cada marcador em cada metodologia, realizou-se a análise por PCA e obteve-se os gráficos PC1 x PC2 (Figura 60) e PC1 x PC2 (Figura 61). A partir da análise das Figuras 60 e 61, evidencia-se que não há diferenças discrepantes entre as análises, uma vez que as mesmas se agruparam conjuntamente. Além disso, observa-se a formação de três grupos em cada figura com os seus respectivos correspondentes.

**Figura 60:** Gráfico de pesos PC1 x PC2 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.

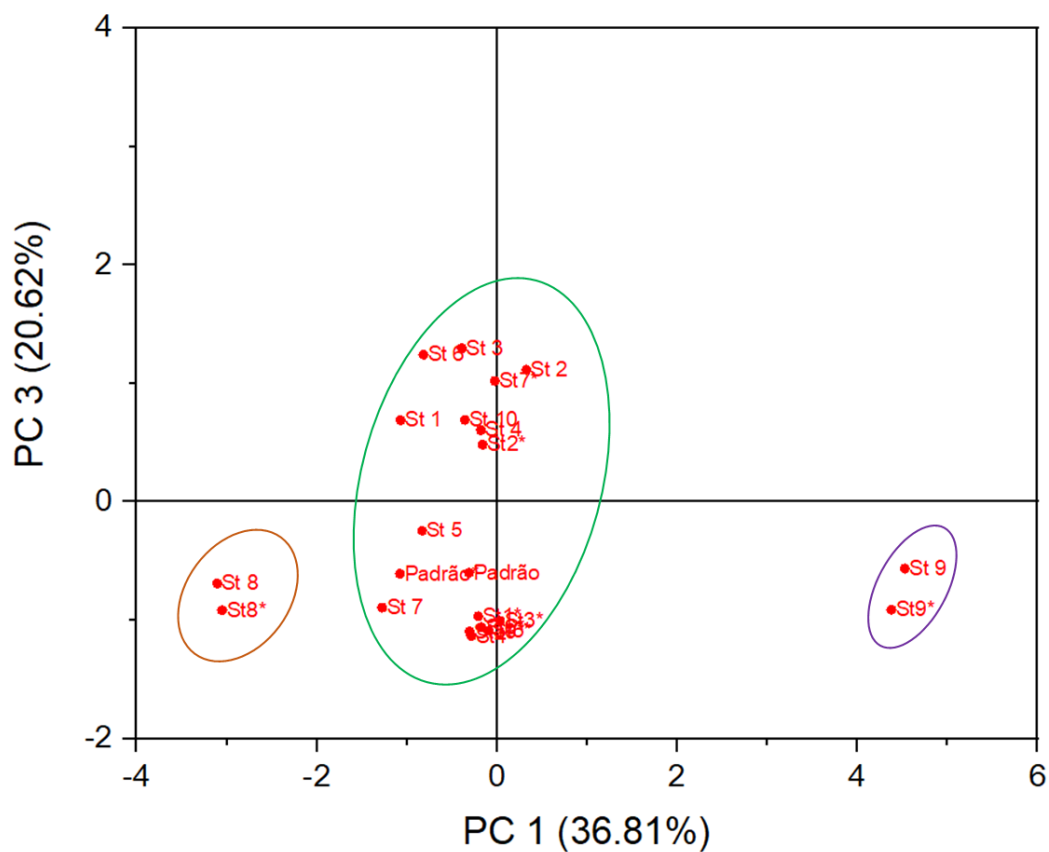


Figura 61: Gráfico de pesos PC1 x PC3 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.

Ambas figuras, apresentam um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pelas amostras St8* e St8, um segundo grupo composto pelas amostras St9 e St9*, um terceiro grupo formado pela amostra padrão e as demais. As siglas das amostras contendo asterisco (*), referem-se as análises realizadas por UV-Vis.



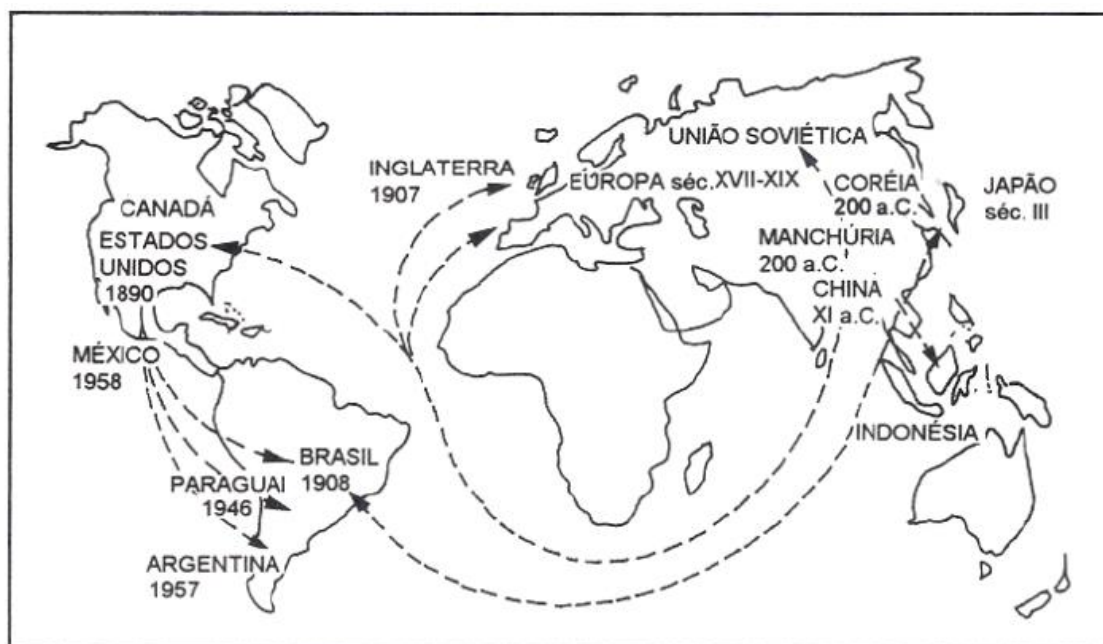
Fonte: <https://plantasmedicinas.blogs.sapo.pt/isoflavonas-de-soja-2338>

Isoflavona de soja

6. *Glycine max* L. (isoflavona de soja)

6.1 A soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merri.) é uma espécie de planta diploide ($2n=40$), pertencente à família Fabaceae (Leguminosa), de autofecundação e com ciclo de vida anual. O seu surgimento como cultura alimentar ocorreu no nordeste da China em torno de 1700 – 1100 a.C., sendo uma das mais antigas plantas cultivadas (HARTMAN *et al.*, 2011). A expansão do cultivo da soja teve seu início provável entre o ano 200 a.C. e 300 d.C. Coréia e Japão foram os primeiros países a cultivarem a soja além dos limites territoriais da China (Figura 62) (BONETTI, 1981).



Fonte: BONETTI, 1981

Figura 62: Centro de origem e disseminação da soja no mundo.

Somente entre o final do século XV e início do XVI a soja chegou ao ocidente, mas durante os quatro séculos seguintes foi considerada apenas como curiosidade botânica. A introdução da soja em países ocidentais (França e Inglaterra) ocorreu entre os séculos XVII e XIX. Com a expansão do intercâmbio com o Oriente, a partir de 1900, a importância desta planta cresceu consideravelmente, de modo que a primeira grande importação ocorreu em 1907 com o embarque de cerca de 500 toneladas de soja de Hankow para Liverpool, na Inglaterra (MORAIS, 1996).

No continente americano, a soja adquiriu importância a partir de 1880, essencialmente nos Estados Unidos, ainda como uma cultura forrageira e em 1940, foram plantados cerca de dois milhões de hectares desta planta. Desde 1941, a produção de grãos superou o cultivo forrageiro e iniciou um crescimento exponencial no cultivo mundial da soja, não somente nos E.U.A, como no resto do mundo (MORAIS, 1996).

No continente africano, a introdução desta planta ocorreu em 1910 em áreas restritas. Na Austrália seu cultivo data de cerca de 50 anos, entretanto a importância dispensada a este cultivo ocorreu nos últimos 20 anos (MORAIS, 1996).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1882 e os primeiros estudos de avaliação foram desenvolvidos pelo professor Gustavo Dutra, da Escola de Agronomia da Bahia. O primeiro registro de cultivo de soja no país data de 1914, no município de Santa Rosa (RS). Entretanto, foi somente em 1949 que o Brasil, com 25.000 toneladas de grãos, já se colocava no cenário internacional como um grande produtor de soja (CISOJA, 2006).

A partir da década de 60, o cultivo de soja consolidava-se como uma das principais culturas do agronegócio brasileiro. Entre os anos de 1954 e 1958 o Brasil participava com apenas 0,5% da produção mundial de soja. Mas em 1976 respondia por 16% da produção mundial. Isso ocorreu devido à fatores como mecanização total da cultura, geração de tecnologias adaptadas às diferentes condições do país, sua utilização como cultura sucessória ao trigo, possibilitando o aproveitamento da área e de equipamentos, dentre outros (REETZ *et al.* 2013).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (27%), seguido da Argentina (19%), China (6%) e Índia (4%). Os Estados Unidos são o maior produtor mundial deste grão (35%) (SOYSTATS, 2011). Para a safra 2011/12, a produção brasileira deve crescer 1% somando 75,34 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2011), sendo que a produção brasileira de grãos deve ficar entre 157,2 e 160,5 milhões de toneladas para esta safra. A produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no centro oeste brasileiro, o maior produtor brasileiro de soja, com um volume estimado entre 17,9 e 18,2 milhões de toneladas, seguido do Paraná (12,8 e 13,0 milhões de toneladas) e do Rio Grande do Sul, onde a pesquisa indica uma produção entre 8,2 e 8,3 milhões de toneladas (SOJA, 2010 e EMBRAPA 2011).

6.1.2 Classificação da soja

A soja (Figura 63) possui nome científico *Glycine max* (L.) Merrill, e assim como o feijão, lentilha, grão de bico e ervilha é uma leguminosa. Esta planta pertence ao ramo Fanerogama, divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leuminosae, subfamília Papilionideae e ao gênero *Glycine* L (MORAIS, 1996).



Figura 63: Detalhe das folhas e frutos do exemplar de *Glycine max*.

O gênero *Glycine* possui 10 espécies, com poucas variedades. As espécies estão distribuídas em três subgêneros: *Glycine*, *Bacytreata* e *Soja*, nos quais o mais importante economicamente é o subgênero *Glycine*, pois neste está incluída a soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill), que se constitui como importante fonte de alimento para seres humanos e animais, tendo em vista seu elevado teor de nutrientes (MORAIS, 1996).

6.1.3 Estrutura e composição dos grãos de soja

A semente ou grão compreende três partes principais: a casca, os cotilédones e o hipocótilo, de modo que a composição média dos grãos em proteínas, lipídios, carboidratos e fibras, e as proporções respectivas de suas partes principais são mostradas na Tabela 25.

Tabela 25: Composição média das diferentes partes do grão de soja (MORAIS, 1996)

Composição % (base seca)					
	% no grão	Proteínas (N x 6,25)	Lipídeos	Carboidratos	Cinzas
Grão inteiro	100	40	20	35	4,9
Cotilédone	90	43	23	29	5,0
Casca	8	8,8	1	86	4,3
Hipocólito	2	41	11	43	4,4

Esta composição varia, essencialmente, com o genótipo e fatores climáticos, principalmente: temperatura, umidade do solo e luminosidade (MORAIS, 1996).

Os carboidratos constituem 34% da soja aproximadamente, e correspondem a polissacarídeos insolúveis (como pectinas), e oligossacarídeos solúveis (como hexose e sacarose). A composição em carboidratos da soja é descrita na Tabela 26.

Tabela 26: Distribuição dos carboidratos na semente de soja (MORAIS, 1996)

Carboidrato	Teor médio (%)
Celulose	4,0
Hemicelulose	15,0
Estaquiase	3,8
Rafinose	1,1
Sacarose	5,0
Outros	5,1

As cinzas são ricas nos minerais ferro e zinco. Os lipídios da soja incluem de 1,0 a 3,0% de substâncias não saponificáveis, como alguns esteróides (estigmasterol, campesterol e sitosterol), tocoferóis e vitamina A (Figura 64), de modo que o óleo de soja contém cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados (MORAIS, 1996).

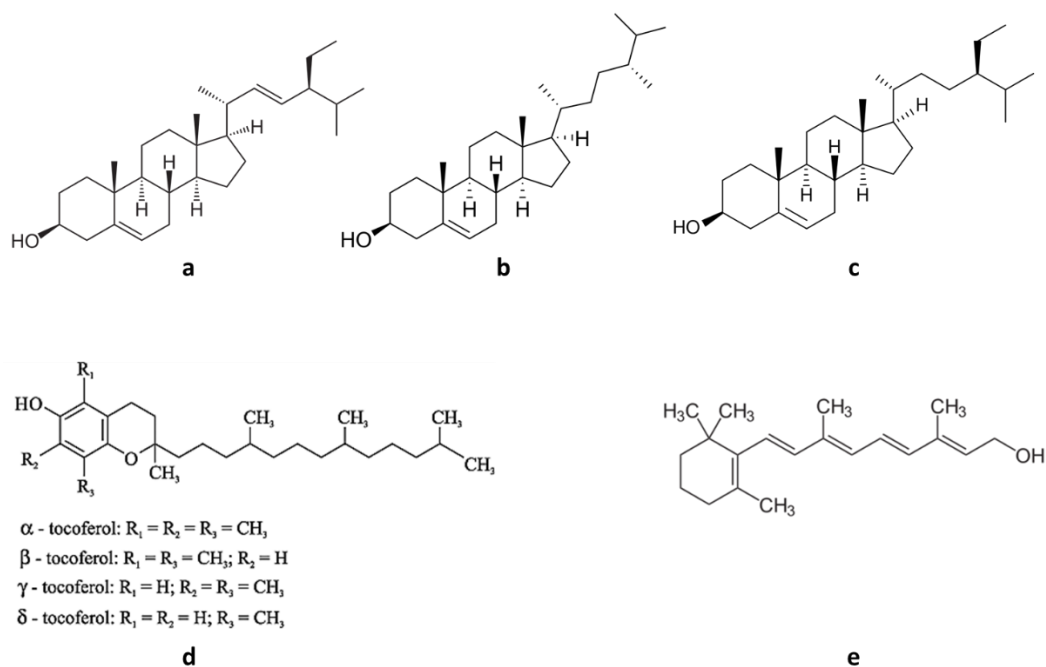


Figura 64: Principais esteróides encontrados em *Glycine max*. (a) estigmasterol, (b) campesterol, (c) sitosterol, (d) tocoferóis e (d) vitamina A.

A casca é formada por quatro ou cinco camadas sobrepostas contendo células de diferentes tipos. Os cotilédones são constituídos por células denominadas “corpos protéicos” e contêm a maior parte das proteínas do grão, (como as globulinas), que constituem cerca de 90% do teor de proteína da soja. As globulinas têm solubilidade mínima em torno de pH 4,5 e servem como substrato nutritivo para o crescimento do embrião. As proteínas restantes a exemplo das proteínas estruturais e funcionais estão localizadas no restante da semente (CHEFTEL *et al.*, 1989). A casca da soja contém também 87% das fibras de (40 a 53%) celulose, (14 a 33%) hemicelulose e (1 a 3%) lignina (MORAIS, 1996).

Os grãos de soja contêm vários tipos de vitaminas. Quando verde o grão é rico em riboflavina, niacina e ácido ascórbico. Porém, quando está madura ela é rica nas vitaminas E e K. Apresenta-se como boa fonte de tiamina e ácido fólico, mas pobre em vitamina A, não contendo as vitaminas D e B₁₂ (Tabela 27) (MORAIS, 1996).

Tabela 27: Teores de vitaminas na soja (MORAIS, 1996).

Vitaminas	Teor médio (ug.g⁻¹)
Tiamina	15,00
Riboflavina	3,5
Niacina	22,0
Piridoxina	9,3
Biotina	0,8
Ácido pantotênico	16,8
Ácido fólico	1,9
Colina	3400
Caroteno	1,34
Vitamina E	1,4
Vitamina K	1,9

O grão da soja contém também muitos minerais, com destaque para potássio, magnésio, fósforo, ferro e cobre, sendo considerada uma fonte moderada de cálcio e rica em sódio. O teor de cálcio presente nos grãos se apresenta pouco disponível para a nutrição humana, diferentemente para os produtos industrializados os quais são enriquecidos com este mineral (MORAIS, 1996). A Tabela 28 descreve a composição em minerais presentes na soja.

Tabela 28: Composição em minerais da soja (MORAIS, 1996).

Minerais	Teor médio (mg/100g)
Cálcio	240
Fosforo	630
Ferro	14
Potássio	360
Sódio	1800
Magnésio	230
Enxofre	410
Iodo (ppm)	0,01
Cobre (ppm)	12

Além destas espécies, são encontrados também nos grãos de soja substâncias em menor concentração como os fitatos, saponinas, antivitaminas, etc. Estes compostos, assim como alguns polissacarídeos, seja no aspecto nutricional e/ou toxicológico, são indesejáveis quando em elevadas concentrações, havendo a necessidade de desnaturalização pelo calor ou eliminação por extração (CHEFTEL *et al.*, 1989).

6.1.4 As isoflavonas de soja

Fitoestrógenos são definidos como qualquer tipo de substância de origem vegetal, semelhantes estrutural e/ou funcionalmente aos estrógenos placentários do ovário e seus metabólitos ativos (WHITTEN e PATISAUL, 2001).

Nas plantas, os fitoestrógenos são metabólitos secundários que podem agir como fungicidas, reguladores hormonais e protetores contra radiação UV. Diversos tipos de plantas produzem essas substâncias que podem mimetizar ou interagir com estrógenos hormonais em animais. Existe uma lista de 20 fitoestrógenos que foram identificados em 300 plantas, de 16 diferentes famílias (COLBORN *et al.*, 1996). Esses fitocompostos possuem menor poder estrogênico que os estrógenos endógenos e sintéticos e estão presentes em concentrações elevadas em ervas, grãos, vegetais e frutas (LIGGINS *et al.*, 2000).

Alguns desses alimentos são comercializados mundialmente, especialmente a soja que é consumida em níveis elevados de forma direta ou indireta (ADLERCREUTZ *et al.*, 1991). Estudos apontam que o consumo de soja e derivados promovem benefícios à saúde, colocando a soja em posição de destaque no que se refere ao estudo dos alimentos denominados nutracêuticos (MORAES *et al.*, 2006). Embora, as pesquisas sobre os fitoestrógenos, em sua maioria, afirmem que esses produzem efeitos positivos sobre saúde humana (SETCHELL e CASSIDY, 1999; LISSIN e COOKE, 2000; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002), algumas pesquisas têm mostrado o efeito dessas substâncias como alteradores endócrinos, o que poderia causar *intersex* em organismos aquáticos (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

Cientistas têm focado sua atenção em dois principais grupos de fitoestrógenos: as isoflavonas e as lignanas. Dentre os componentes da soja, aqueles que mais têm despertado interesse da comunidade científica são as isoflavonas. As boas condições de saúde constatadas em países orientais têm sido associadas à presença de isoflavonas nestes alimentos (FERRARI *et al.*, 2001).

As isoflavonas são uma subclasse dos flavonoides, os quais possuem importantes atividades biológicas como antioxidantes. Além disso, no caso dos isoflavonoides, que apresentam estrutura semelhante ao estrógeno humano e sintético, mimetizam esta atividade. Além disso, apresentam atividade antifúngica e anticancerígena (TRISOJA, 2009).

Estas substâncias têm distribuição extremamente limitada na natureza, principalmente na família Leguminosae. Somente na soja as isoflavonas estão presentes em quantidades nutricionalmente relevantes (MESSINA *et al.*, 2000). Nos grãos de soja as isoflavonas são encontradas glicosiladas ou livres (FERRARI *et al.*, 2001). As isoflavonas mais comuns são genisteína, daidzeína e gliciteína (Figura 65) que ocorrem sob a forma de agliconas, glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos (WANG e MURPHY, 1994).

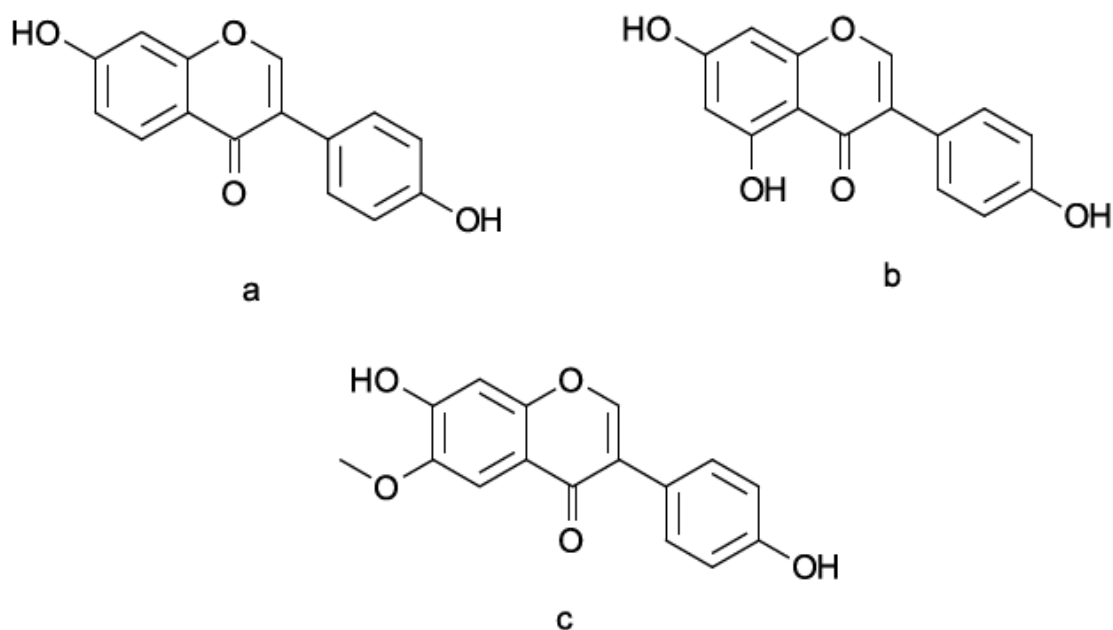


Figura 65: Estrutura química das principais isoflavonas da soja: (a) Daidzeína, (b) Genisteína e (c) Gliciteína.

As formas agliconas são as mais ativas do ponto de vista biológico (TRISOJA, 2009). A estrutura básica da aglicona consiste de um esqueleto 3-fenilcromona com grupos hidroxílicos nas posições 4'- e 7-. Dependendo dos substituintes nos carbonos 5- e 6-, podem existir na soja principalmente três tipos de agliconas, nominados como

daidzeína, genisteína e gliciteína. Na soja, as isoflavonas ocorrem como 7-O-glicosídeos com os nomes usuais de daidzina, genistina e glicitina (Figura 66). Adicionalmente, todos estes glicosídeos podem também ocorrer como ésteres na posição 6''-O- do glicosídeo ligados a grupos acetilas ou malonilas originando outros seis compostos conhecidos comumente como acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina (Figura 67) (PENALVO *et al.*, 2004).

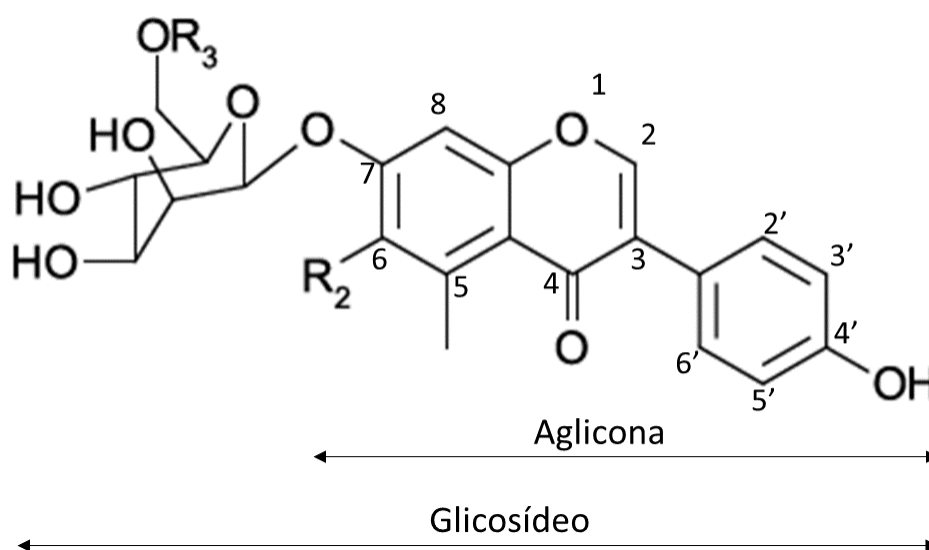


Figura 66: Estrutura geral de isoflavonas (WANG *et al.*, 1994).

As duas principais isoflavonas são a genisteína e daidzeína ou em suas respectivas formas com glicosídeos, a genistina e daidzina. Estes compostos não apresentam características nutricionais, no entanto são bioativos, apresentando parte de sua estrutura química semelhante a dos estrógenos humanos, tal como o 17- β -estradiol, principal hormônio feminino, possuindo a capacidade de se encaixar nos receptores de estrógeno. Deste modo, estas substâncias apresentam, portanto, atividade estrogênica, sendo comumente referenciados como fitoestrógenos (QUEIROZ *et al.*, 2006), o que caracteriza o interesse científico neste tipo de estudo considerando a possibilidade de constatação de benefícios à saúde e reposição hormonal (EMBRAPA, 2009)

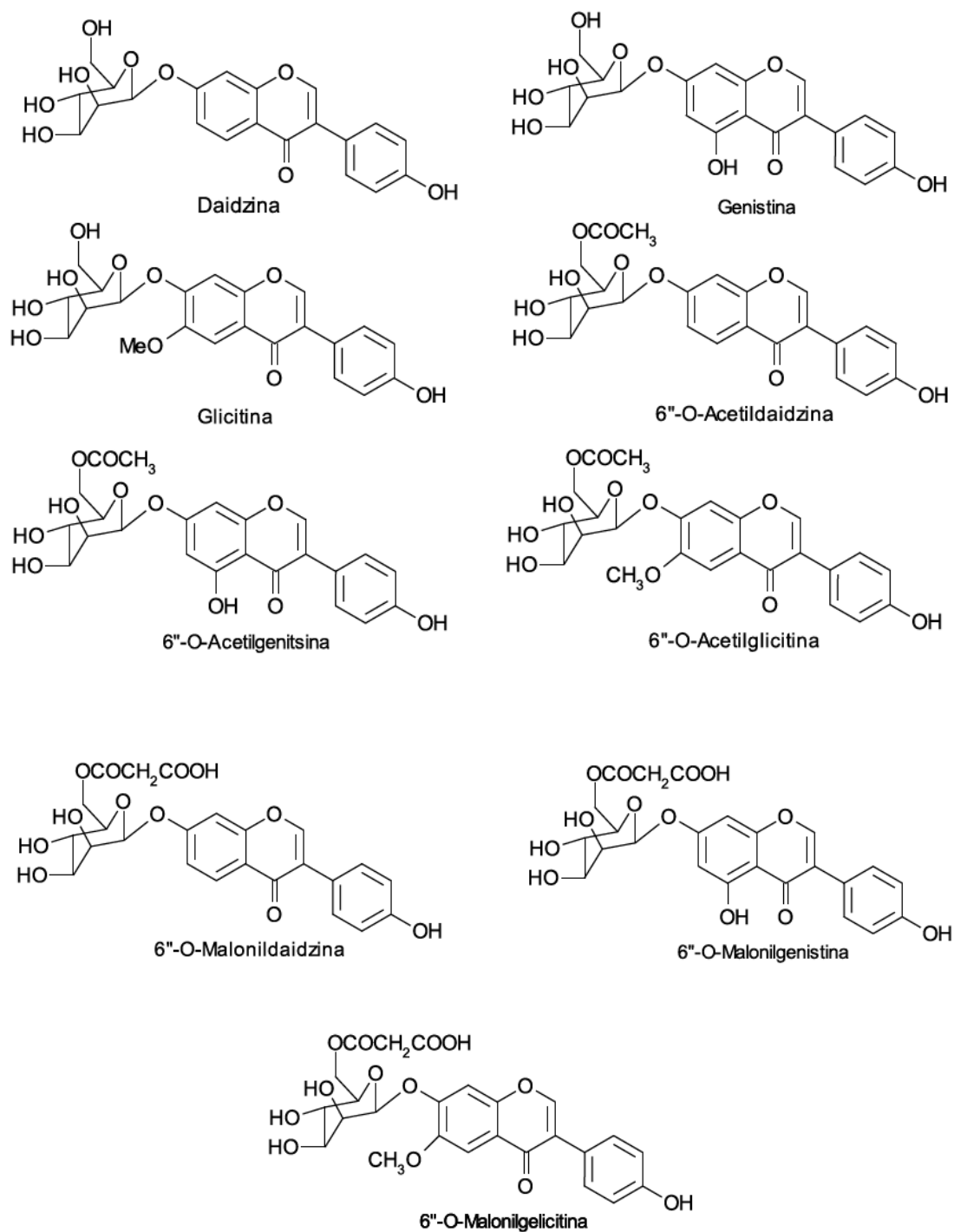


Figura 67: Representação das principais isoflavonas presentes em *Glycine max* L.

Quando consumidas, as isoflavonas glicosídicas são hidrolisadas no intestino delgado por enzimas denominadas beta-glicosidases intestinais, disponibilizando as agliconas biologicamente ativas, as quais são absorvidas ou fermentadas pela microflora intestinal, dando origem a seus metabólitos, as agliconas daidzeína, genisteína e

gliciteína, que são as formas biologicamente ativas e atuarão beneficemente no organismo humano (TRISOJA, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2006).

Estudos apontam que a saliva humana é capaz de converter glicosídeos em agliconas (PENALVO, 2004) o que explica o fato de que as agliconas podem ser absorvidas em certa extensão no estômago, antes da absorção no intestino delgado. Efetivamente, somente agliconas são absorvidas, e por isso a diferenciação entre as possíveis formas de isoflavonas em produtos de soja pareça ser um tanto quanto irrelevante, tendo em vista que os efeitos fisiológicos são devidos às agliconas (TASHIRO *et al.*, 2004)

As isoflavonas absorvidas são então transportadas para o fígado, sendo removidas da circulação sanguínea, retornando ao intestino pela via biliar, podendo ser excretada pelas fezes. No entanto, uma porcentagem consegue desviar da rota e entrar na circulação periférica, alcançando os tecidos, sendo eliminadas pelos rins, de maneira similar aos estrógenos endógenos (DEWELL *et al.*, 2002)

A biodisponibilidade das isoflavonas da soja é, portanto, influenciada por um intestino saudável, com a microflora capaz de converter estas isoflavonas às suas formas ativas (QUEIROZ *et al.*, 2006).

As isoflavonas da soja podem agir de três formas diferentes: (i) como estrógenos e antiestrógenos, (ii) como inibidores de enzimas ligadas ao desenvolvimento do câncer e (iii) como antioxidantes. Quando associadas aos receptores de estrógeno, exercem ação estrogênica ou antiestrogênica, dependendo do nível de hormônios sexuais. Embora estudos mostrem que os efeitos estrogênicos das isoflavonas sejam muito pequenos (1/1.000 a 1/100.000 menos que a atividade do estradiol), elas podem ao mesmo tempo exercer um efeito agonístico sobre os estrogênios endógenos. Na presença dos estrogênios elas funcionam como antiestrógenos, competindo pelos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes na célula, evitando que este hormônio exerça seus efeitos indesejáveis, a exemplo do aumento do risco de câncer de mama nas mulheres (TRISOJA, 2009).

Na menopausa, é constatada a ausência de estrogênio e essas substâncias encontradas na soja apresentam efeito estrogênico e substituem o hormônio que se apresenta em baixas concentrações, aliviando os sintomas indesejáveis da menopausa e reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares e de osteoporose adquiridos pela ausência do estrogênio humano (FERRARI e DEMIATE, 2001).

Atualmente, a genisteína tem sido muito estudada, não somente por causa do seu potencial efeito anti-estrogênico, mas também por que inibe várias enzimas envolvidas em processos de carcinogênese, a exemplo da tiroxina proteína quinase responsável pela indução tumoral promovida pela fosforilação dos oncogenes que controlam o crescimento e a regulação celular; aumentando a concentração do fator β de crescimento tumoral (TGF β), que atua na inibição do crescimento de células cancerosas (KONDO *et al.*, 2002).

A concentração da genisteína na maioria dos derivados de soja varia de 1-2 mg/g. As populações orientais, que apresentam baixa incidência de câncer de mama e próstata, consomem cerca de 28 g de genisteína por dia, enquanto que nos E.U.A. o consumo é somente de 1-3 mg/dia (QUEIROZ *et al.*, 2006). O efeito antioxidante das isoflavonas está associado à atuação dos fitoestrógenos genisteína e daidzeína, que inibem a produção de espécies reativas do oxigênio, as quais estão envolvidas na formação de radicais livres. Estudos mostram que como antioxidantes, têm a capacidade de neutralizar ou tornar mais lenta a taxa de oxidação do LDL – colesterol. A genisteína inibe também a agregação plaquetária e a migração e proliferação de células da musculatura lisa (ABMBN, 2010).

A concentração de isoflavonas na soja e seus derivados pode variar muito, pois depende da variedade do grão, solo, clima, local onde foi cultivada e principalmente o tipo de processamento utilizado no preparo do alimento. O departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América bem como vários outros grupos de pesquisa têm publicado valores para o teor de isoflavonas em uma variedade de produtos de soja. Uma porção de um alimento de soja tradicionalmente consumido, como um copo de leite de soja ou 100 a 120 g de tofu, contém cerca de 30 mg de isoflavonas. Proteína isolada de soja (< 90% de proteína) e farinha desengordurada de soja (cerca de 50% de proteína) contém cerca de 0,5 a 2 mg e 2 a 3 mg de isoflavonas por gramas de proteína, respectivamente. As Isoflavonas são termicamente estáveis. A ação de assar ou fritar alguns destes alimentos não altera o conteúdo de isoflavonas total (MESSINA e MESSINA, 2000)

6.2 Resultados e Discussão

Para validação de todo e qualquer método analítico instrumental alguns testes analíticos e estatísticos foram realizados. Estes testes garantem a confiabilidade e exatidão dos resultados obtidos pela metodologia utilizada. Para tanto foram seguidas as Boas Práticas de Laboratorio (BPL) recomendada por Wells e Cofino (1993), para assegurar a qualidade dos resultados fornecidos.

6.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.

6.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório

O primeiro passo para análise em HPLC é separar, com boa resolução, todos os compostos de interesse presente em uma solução padrão. Este estudo consiste em pesquisar qual a melhor fase móvel e sua composição, para obtenção de picos resolvidos.

Estabelecido as condições de separação para os composto padrões presentes em *G. max* L., não foi difícil otimizar as condições, para obter os valores de k aceitáveis. Para isso foi utilizado uma programação de gradiente de eluição. Após alguns ensaios chegou-se a uma programação ideal do gradiente de eluição, conforme Figura 9, descrita anteriormente. O cromatograma da Figura 68, mostra a separação de todos os compostos em tempo de análise menor que 30 min. A Tabela 29 apresenta os parâmetros de separação obtidos.

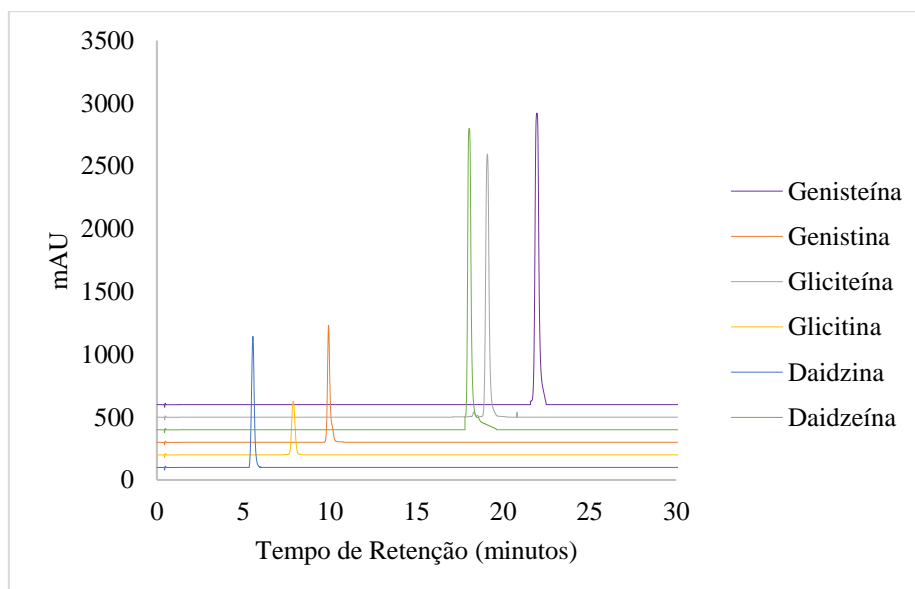


Figura 68: Cromatograma dos padrões utilizados como marcadores para *G. max* L., Daidzeína (azul), Glicitina (amarelo), Genistina (laranja), Daidzeína (verde), Gliciteína (cinza) e Genisteína (lilás).

A Tabela 29 resume os tempos de retenção, fator de retenção e fator de separação ou seletividade para cada amostra padrão em *G. max* L.

Tabela 29: Combinação de eluição das amostras padrões de *G. max* L.: Daidzeína, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína .

Amostra	t_R	k	α	Rs	N
Daidzina	5,53	11,06	-	-	1359,15
Glicitina	7,9	15,8	1,4	2,8	2773,78
Genistina	9,92	19,84	1,3	4,02	6298,01
Daidzeína	12,06	24,12	1,2	2,7	1923,22
Gliciteína	19,09	38,18	1,6	1,52	5830,85
Genisteína	21,97	43,94	1,2	35,3	4569,76

* **t_R** = tempo de retenção (minutos); **k** = fator de retenção e **α** = fator de separação ou seletividade, **Rs** = Resolução, **N** = Numero de pratos teóricos.

Comparando os valores de *k* e *Rs* obtidos com os valores exigidos pela literatura, *k* entre 2 e 20 e *Rs* maior o igual a 1,5 (SNYDER *et al.*, 1997), adotou-se estas condições para a separação dos compostos. Isto significa que, nestas condições os compostos analisados estão resolvidos, ou seja, otimamente separados. Na presença de interferentes, analisando amostras reais, estes fatores devem continuar constantes. Outros fatores como pH e força iônica da fase móvel não foram estudados, pois o método proposto apresentou-se eficiente. Verificou-se também, que fatores como estes são menos utilizados para separação destes compostos, segundo a bibliografia (BARCELÓ *et al.*, 1992; VITALI *et al.*, 1994; PALACIOS *et al.*, 2005). A Figura 69 apresenta os padrões para análise de *G. max* L. sumarizados em uma única análise.

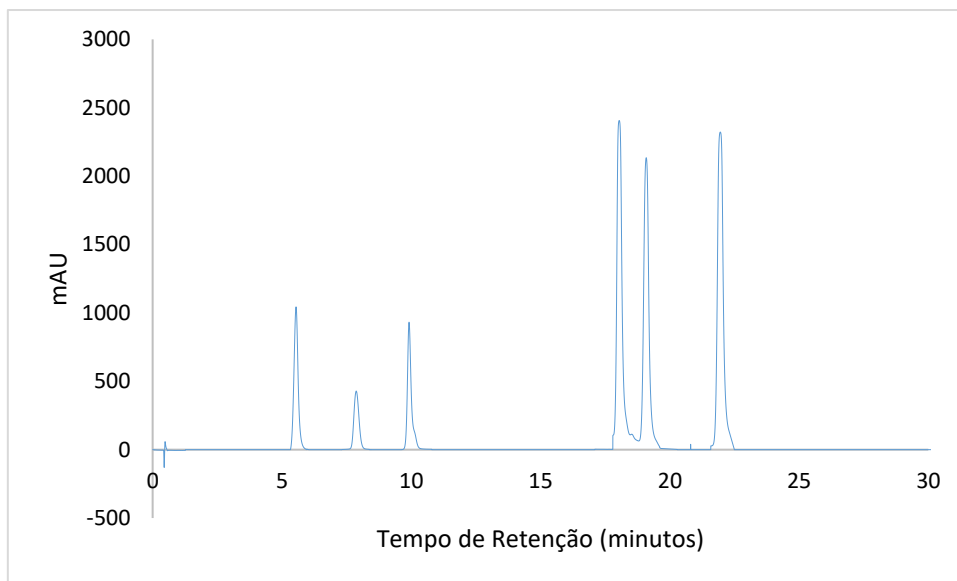


Figura 69: Espectro dos padrões combinados de *G. max* L.: Daidzína, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína, respectivamente.

O uso de ácidos na fase móvel é imprescindível para prevenir a ionização dos grupos hidroxilas presentes em compostos fenólicos, permitindo uma melhor separação e simetria do pico (CARVALHO *et al.*, 2009). O ácido trifluoracético é um ácido mais forte, tornando o pH da fase móvel mais ácido com a adição de uma menor quantidade quando comparado com o ácido acético.

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. O valor de resolução calculado foi acima de 2,0, o que mostra a total separação entre os picos, exceto para gliciteína, entretanto, esse fator não impede a determinação desse metabólito nas amostras analisadas. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA *et al.*, 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos seis marcadores.

6.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores

A varredura espectral de 200 a 800 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e assim uma melhor resposta de sinal cromatográfico.

Considerando o espectro UV dos padrões obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos (Figura 70a-f), o cromatograma dos padrões foi obtido em 265 nm (Figura 71).

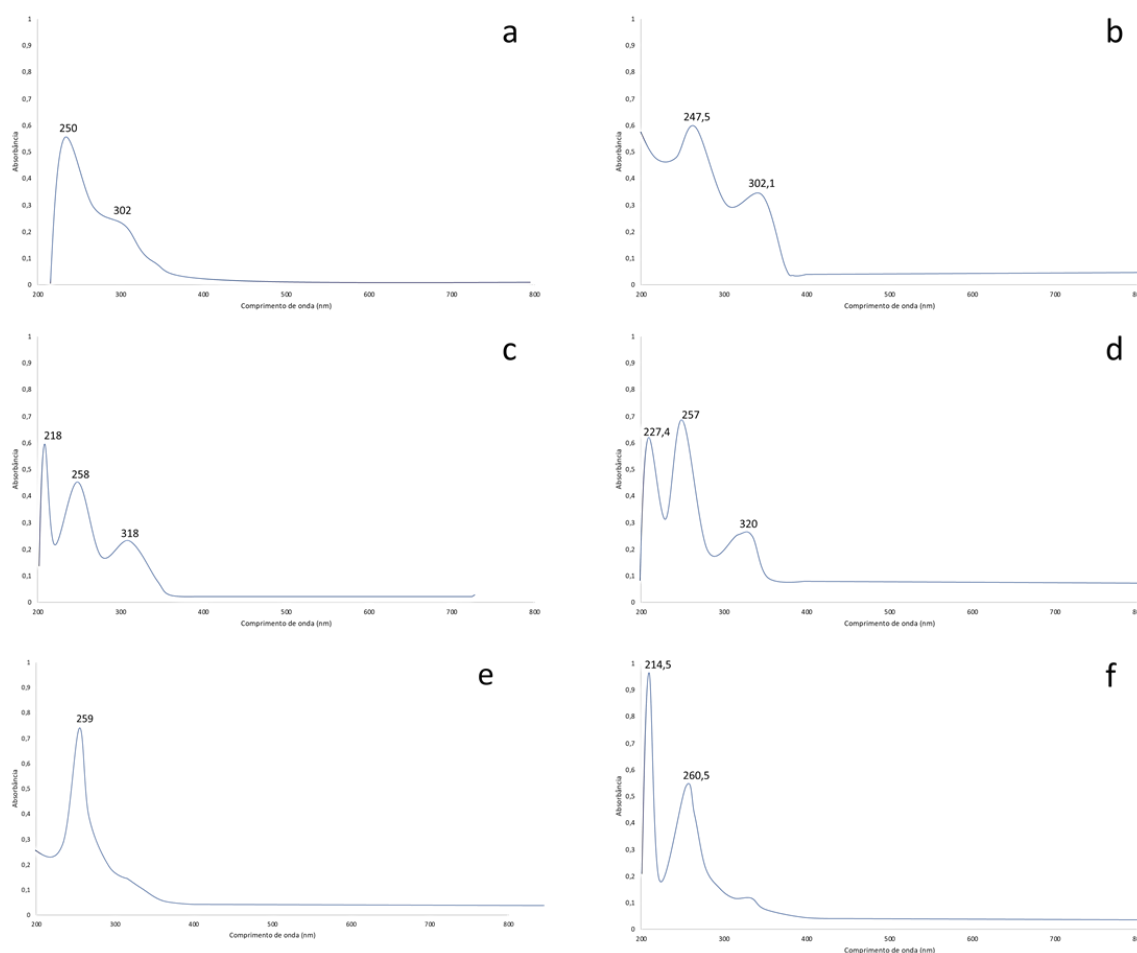


Figura 70: Espectro de UV dos compostos Daidzina (a), Glicitina (b), Genistina (c), Daidzeína (d), Gliciteína (e) e Genisteína (f).

A daidzina e daidzeína apresentaram espectros na região do ultravioleta (Figura 70) com absorções em λ_{\max} 250 nm, referente à banda II, e 303 nm, referente à banda I; a glicitina e gliciteína revelaram tais bandas λ_{\max} 258 nm (banda II) e 318 nm (banda I); para genistina e genisteína observou-se a banda II em λ_{\max} 260 nm. Nas isoflavonas a banda II é a mais intensa que a banda I.

A identificação preliminar dos marcadores nas amostras estudadas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV, e confirmadas através da co-injeção de soluções dos padrões (Figura 71).

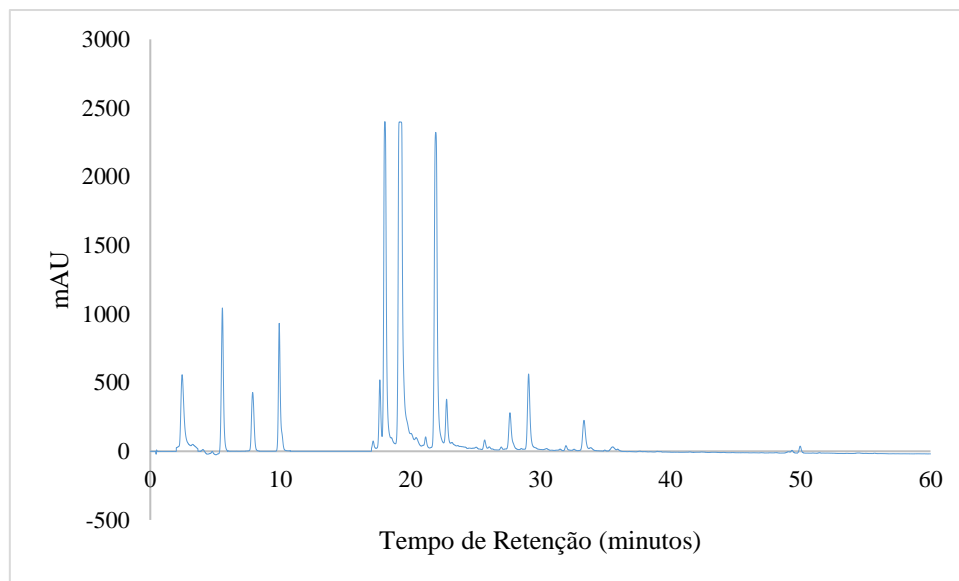


Figura 71: Cromatograma de *G.max* obtido em 265 nm.

6.2.2 Validação do método analítico desenvolvido

6.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O diluente utilizado no preparo das amostras foi injetado nas mesmas condições para verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes, o que foi confirmado como se observa na Figura 72. Os picos que são registrados foram eluídos antes da daidzina que apresenta o menor tempo de retenção (0,50 minutos)

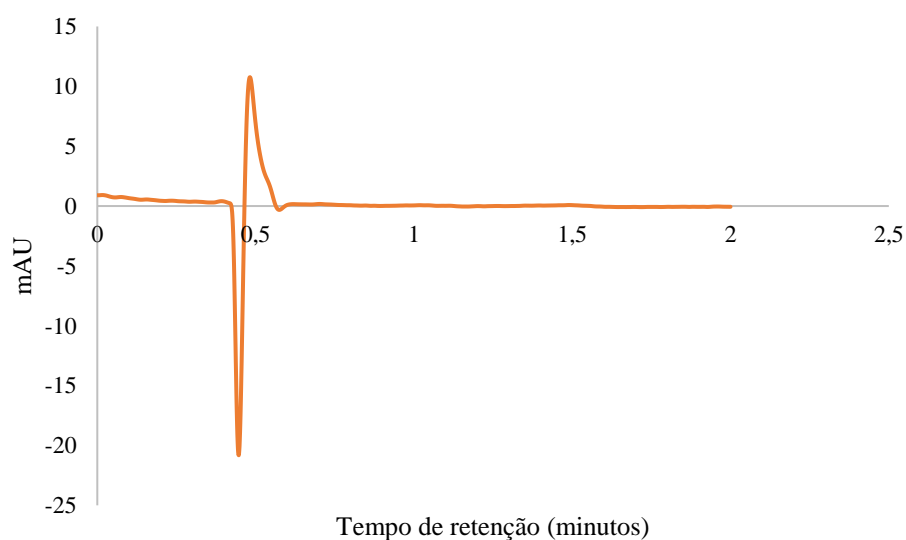


Figura 72: Análise cromatográfica do diluente (metanol) dos marcadores e amostra de *G. max* L.

A pureza do pico também é aceita como uma das condições de avaliação do parâmetro de seletividade, sendo determinada pelo detector DAD (Figura 73).

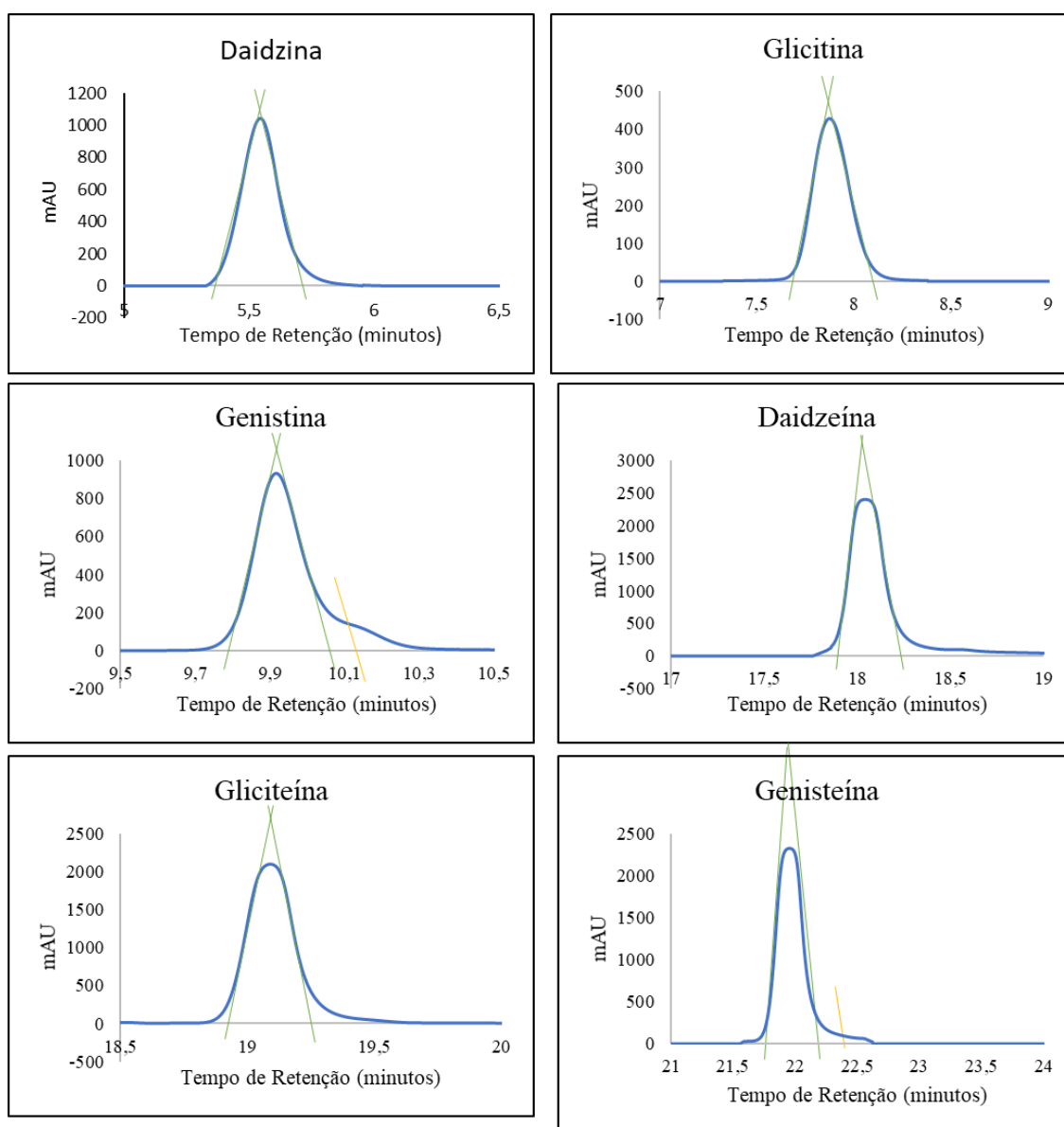


Figura 73: Análise da pureza dos padrões (Daidzina, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína) de *G. max* L. A área entre as barras verdes corresponde a área pura. A área entre a barra verde e amarela corresponde a presença de impurezas.

6.2.2.2 Adição dos marcadores

No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis em uma matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância (ANDRADE, 1987). Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz (SNYDER *et al.*, 1997).

A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse.

A adição de marcadores na amostra de *G. max* L. foi realizada para confirmar os picos referentes a Daidzina, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína. A Figura 74 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *G. max* L. com o cromatograma adicionado dos padrões e na Figura 75 a análise dos marcadores comparando ao cromatograma de *G. max* L.

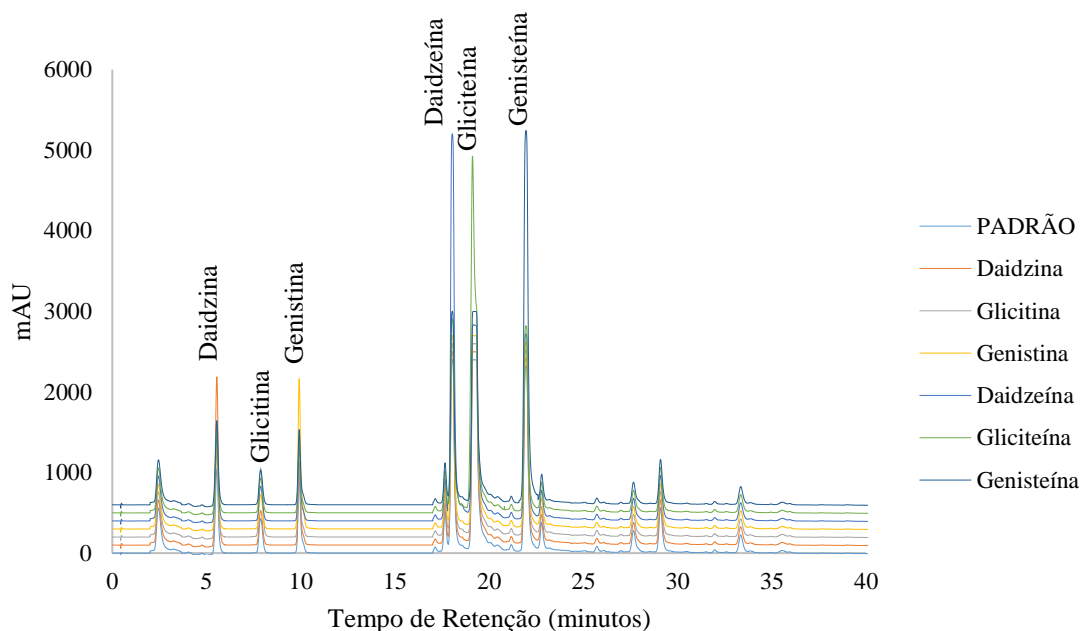


Figura 74: Cromatograma de *G. max* L. juntamente com a adição dos marcadores químicos padrões: Amostra padrão – identificada (azul), Daidzina (laranja), Glicitina (cinza), Genistina (amarelo), Daidzeína (azul claro), Gliciteína (verde) e Genisteína (azul escuro).

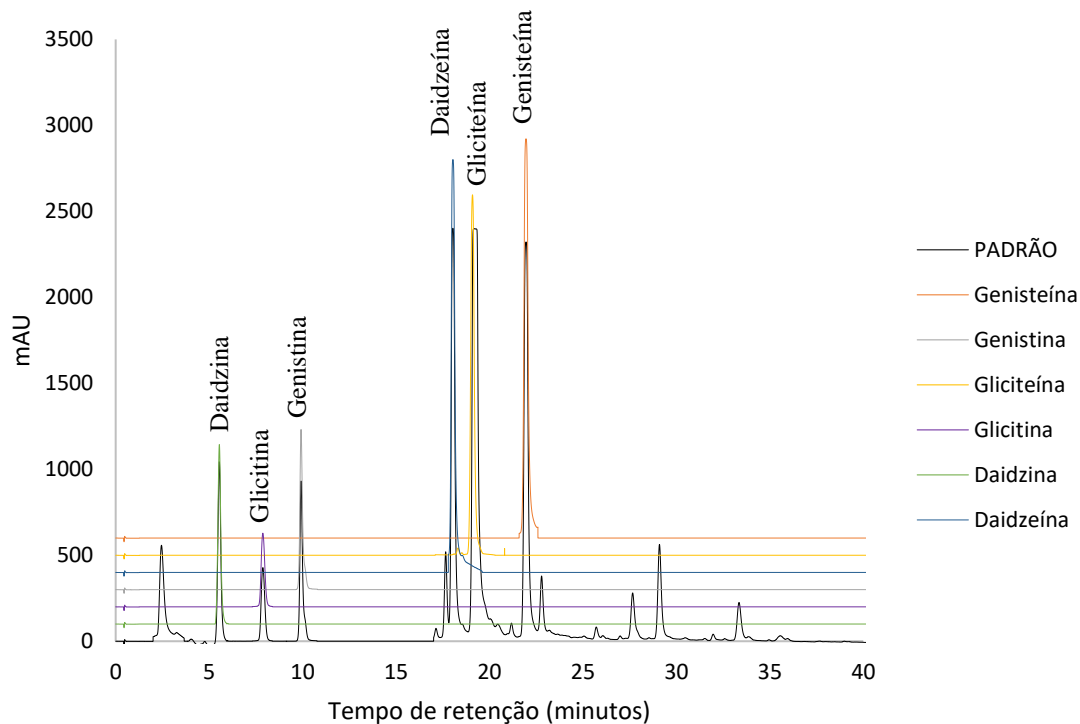


Figura 75: Cromatogramas de *G. max L.* com adição de padrões como marcadores químicos: Amostra padrão – identificada (preto), Daidzina (laranja), Glicitina (cinza), Genistina (amarelo), Daidzeína (roxo), Gliciteína (verde) e Genisteína (azul escuro).

A Figura 76 apresenta o espectro da amostra identificada de *G. max* e o cromatograma da análise dos padrões numa única corrida.

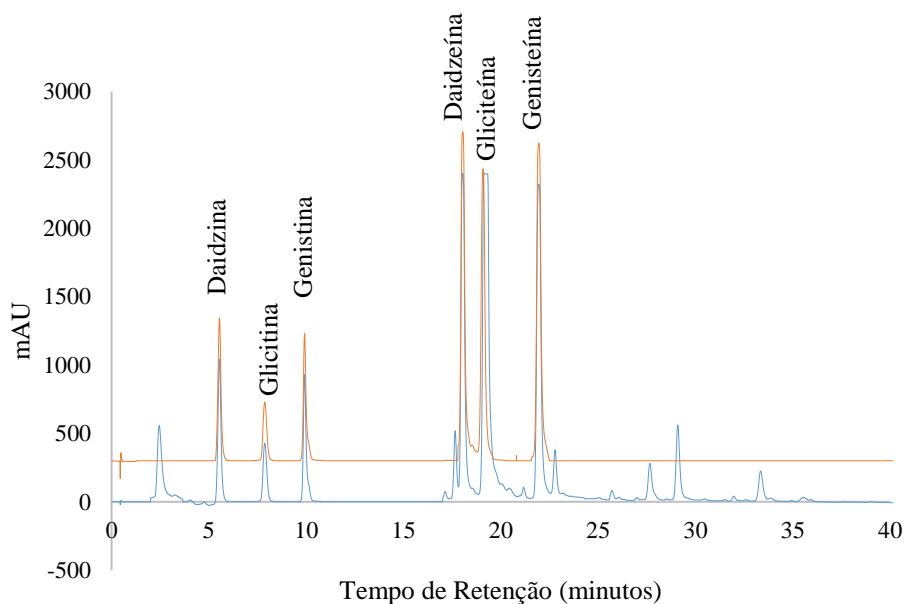


Figura 76: Figura mostrando o cromatograma de *G. max.*, identificado, (azul) e o cromatograma dos padrões (laranja)

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra antes do preparo. Tal método é trabalhoso, entretanto é especialmente importante quando a amostra é complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando há dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (MOREAU, 2008).

A partir da análise das Figuras 74 e 75, pode-se notar que a adição dos padrões ocasionou um incremento nos picos das substâncias analisadas de *G. max*. Tal fato é fundamental para a confirmação de identidade.

6.2.2.3 Robustez

De acordo com o Inmetro (2003), a robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Considera-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel, o pH da fase móvel em 0,1 unidade de pH ou a temperatura da coluna. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

A robustez do método foi comprovada alterando a temperatura do forno, conforme dados apresentados na Tabela 30.

Tabela 30: Avaliação da interferência da temperatura de forno de coluna no método.

	Daidzina				Glicitina				Genistina			
°C	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T
34	5,52	214643	8302	1,68	7,88	54494	8768	1,89	9,90	135641	9933	1,77
35	5,53	214845	8345	1,84	7,90	54356	8843	1,76	9,92	135601	10006	1,35
36	5,53	214716	8345	1,84	7,93	54228	9012	1,93	9,95	135783	10089	1,63
	Daidzeína				Gliciteína				Genisteína			
°C	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T	t_R	Área	N	T
34	12,05	547663	10364	1,77	19,08	345168	10116	1,99	21,97	618338	58206	1,79
35	12,06	547742	10401	1,96	19,09	345199	10189	1,65	21,97	618321	58206	1,79
36	12,07	547698	10446	1,8	19,10	134185	10245	1,56	21,98	618412	58302	1,65

t_R = Tempo de retenção, N = Número de pratos teóricos, T = Fator de cauda.

6.2.2.4 Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada, dentro de uma faixa de aplicação (SWARTZ e KRULL, 1998; ICH, 1995). Recomenda-se que o teste seja realizado com, no mínimo, 5 concentrações diferentes do analito (ICH, 2005; ANVISA, 2003). Pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, através da relação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração da substância fenólica de interesse a ser quantificada (BARROS *et al.*, 2002). A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (CUSTODIO *et al.*, 1997). Sendo também possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r^2) (CHUI *et al.*, 2001). Como critério de aceitação a Anvisa (2013) estipula um coeficiente de correlação igual a 0,98.

A linearidade do método desenvolvido foi analisada frente às seis substâncias: Daidzin, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína utilizadas como substâncias de referência para construção da curva analítica, justificada por ser possível quantificar por CLAE. Outro motivo está relacionado à possível utilização deste extrato na indústria de farmacêutica. Desta forma, o parâmetro da linearidade foi obtido por meio da curva analítica (concentração *versus* área do pico) utilizando a padronização externa dos padrões Daidzin, Glicitina, Genistina, Daidzeína, Gliciteína e Genisteína na faixa de concentração de 0,1 a 50 µg/mL, para a construção de cada curva. Os dados referentes às triplicatas das curvas padrão estão dispostos nas Tabelas 31-36.

Tabela 31: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Daidzina.

Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	3394	2810	4748	3651	994,17	27,23
0,50	17215	17540	16823	17193	359,02	2,09
1,00	36712	30964	40217	35964	4671,59	12,99
2,50	54494	50972	57283	54250	3162,59	5,83
5,00	144513	142158	145016	143896	1525,73	1,06
10,00	239643	236458	241963	239355	2763,80	1,15
25,00	669391	668836	669390	669206	320,14	0,05
50,00	1402704	1427808	1418264	1416259	12671,57	0,89

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 32: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Genistina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	1131	936	1249	1106	157,89	14,28
0,50	5738	5846	5607	5731	119,67	2,09
1,00	12237	10321	13405	11988	1557,20	12,99
2,50	18164	16990	19094	18083	1054,20	5,83
5,00	48171	47386	48338	47965	508,58	1,06
10,00	79881	78819	80654	79785	921,27	1,15
25,00	223130	222945	223130	223069	106,71	0,05
50,00	467568	475936	472754	472086	4223,86	0,89

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 33: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Glicitina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	2828	2341	3123	2764	394,73	14,28
0,50	14345	14616	14019	14327	299,18	2,09
1,00	30593	25803	33514	29970	3892,99	12,99
2,50	45411	42476	47735	45208	2635,49	5,83
5,00	120427	118465	120846	119913	1271,45	1,06
10,00	199702	197048	201635	199462	2303,17	1,15
25,00	557825	557363	557825	557671	266,78	0,05
50,00	1168920	1189840	1181886	1180216	10559,64	0,89

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 34: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Daidzeina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	21649	24944	23568	23387	1654,94	7,08
0,50	107215	107540	106823	107193	359,02	0,33
1,00	140712	140964	140217	140631	380,03	0,27
2,50	200453	204666	203258	202792	2144,76	1,06
5,00	384896	388621	388199	387239	2039,75	0,53
10,00	698338	690586	690358	693094	4542,87	0,66
25,00	1958144	2090916	2328227	2125762	187486,15	8,82
50,00	4250755	4188857	4116538	4185383	67175,89	1,61

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 35: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Genisteína.

Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0,00	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	26174	28691	28565	27810	1418,01	5,10
0,50	130168	130927	129254	130116	837,72	0,64
1,00	189661	182249	193840	188583	5869,87	3,11
2,50	273112	272629	279635	275125	3913,33	1,42
5,00	577580	578165	581554	579100	2145,36	0,37
10,00	1017862	1005863	1012975	1012234	6033,63	0,60
25,00	2850665	2982697	3220747	3018037	187554,67	6,21
50,00	6121027	6092601	6007557	6073728	59042,49	0,97

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 36: Valores referentes à triplicata da curva padrão de Gliciteína.

Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0,00	0	0	0	0	0,00	0,00
0,10	16481	17155	18031	17222	776,92	4,51
0,50	82299	83003	81450	82251	777,88	0,95
1,00	131543	122089	137137	130256	7606,14	5,84
2,50	191050	187286	197101	191812	4951,39	2,58
5,00	433303	431241	435793	433445	2279,51	0,53
10,00	748574	739390	748451	745471	5267,34	0,71
25,00	2094724	2160185	2279764	2178224	93829,61	4,31
50,00	4463218	4474109	4422042	4453123	27461,77	0,62

*DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

As curvas analíticas, mostradas na Figura 77, foram utilizadas para quantificação dos compostos, tanto nas amostra - teste para estudo da recuperação (ou exatidão), como em amostras reais de *G. max* comercializados no estado da Bahia tanto amostras de fitoterápicos.

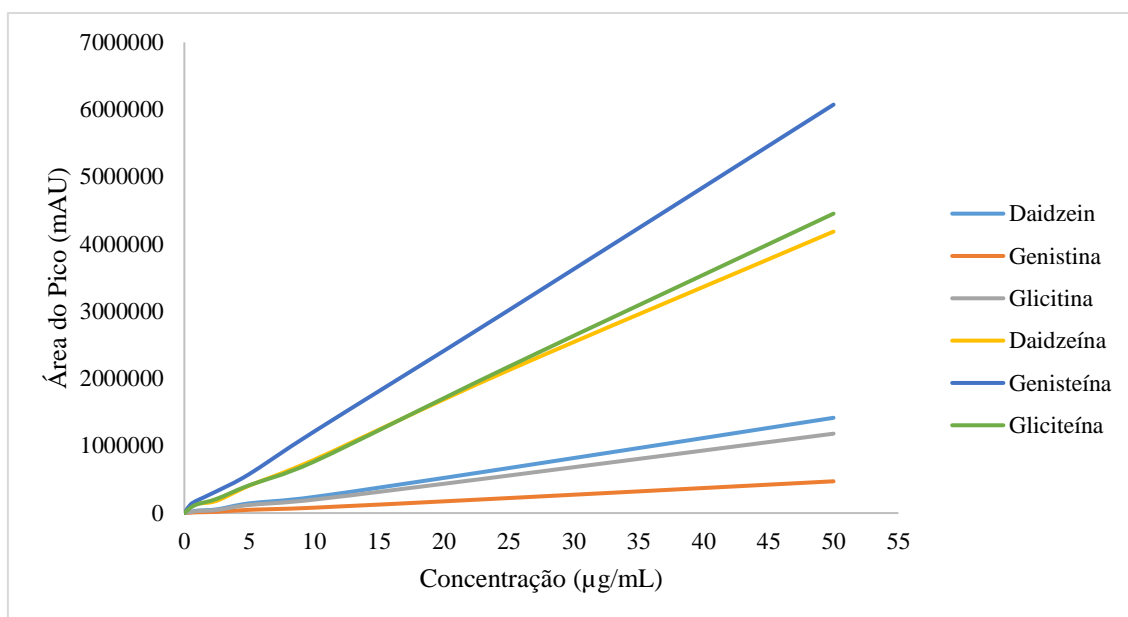


Figura 77: Curvas analíticas dos padrões de *G. max* L.

A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade, uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações dos padrões presentes nas soluções, mostrando valores de coeficientes de correlação (r^2) próximos a 1.

Aplicada a regressão linear dos mínimos quadrados nas curvas analíticas, foi possível obter a equação da reta para cada analito. A Tabela 37 apresenta os valores, de "r", que indicam o coeficiente de correlação, "m" a sensibilidade e "b" a interseção da reta.

Tabela 37: Valores obtidos de "m", "b" e "r" através da regressão linear da curva analítica.

Composto	m	b	r
Daidzina	28089	-7041,8	0,9986
Glicitina	23409	-5912,3	0,9974
Genistina	9363,4	-2364,9	0,9984
Daidzeína	83457	12469	0,9993
Gliciteína	88518	8641,5	0,9989
Genisteína	120693	21944	0,9991

* m - a inclinação da reta, b - a interseção, r - coeficiente de correlação

Estes resultados indicam que a linearidade está dentro do intervalo de concentração testada de daidzin, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína. A correlação dos dados observados na Figura 76, apresentou um coeficiente de correlação superior a 0,98 para todas as substâncias padrões estudadas. De acordo com a RDC 899/2003, especialmente no caso de extratos vegetais, a validação deve seguir a metodologia analítica, no entanto, os resultados podem seguir os critérios de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade do extrato vegetal, permitindo limites de aceitação maiores em relação aos métodos analíticos. Sendo assim, se aceita um coeficiente de correlação linear (r^2) superior ou igual a 0,98 (ANVISA, 2013).

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Guimarães *et al.* (2007) para a quantificação de padrões em folhas de alcachofra por CLAE, apresentando valores de coeficiente de correlação de 0,9908.

Ziliotto *et al.* (2012), demonstraram o coeficiente de correlação médio de 0,999 para a validação de flavonóides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Na pesquisa de Cardoso (2013), também foi verificada a linearidade dos extratos vegetais de *Lafoensia pacari*. Dentre os compostos fenólicos identificados destaca-se o ácido elágico, presente nas soluções com coeficientes de correlação médios (r^2) iguais a 0,9966. Estes resultados corroboram com a presente pesquisa, mostrando que as áreas determinadas no método por CLAE foram diretamente proporcionais às concentrações das soluções para a análise das substâncias fenólicas.

Outra forma de verificar a linearidade é construir um gráfico, fator de resposta (ou sensibilidade) vs concentração do analito, apresentado na Figura 78. Os valores do fator de resposta (área do pico/concentração do analito) foram calculados, a partir dos resultados obtidos das áreas dos picos nas soluções padrão utilizadas anteriormente. Cabe ressaltar, que o fator de resposta deverá ser independente da concentração se o método for verdadeiramente linear.

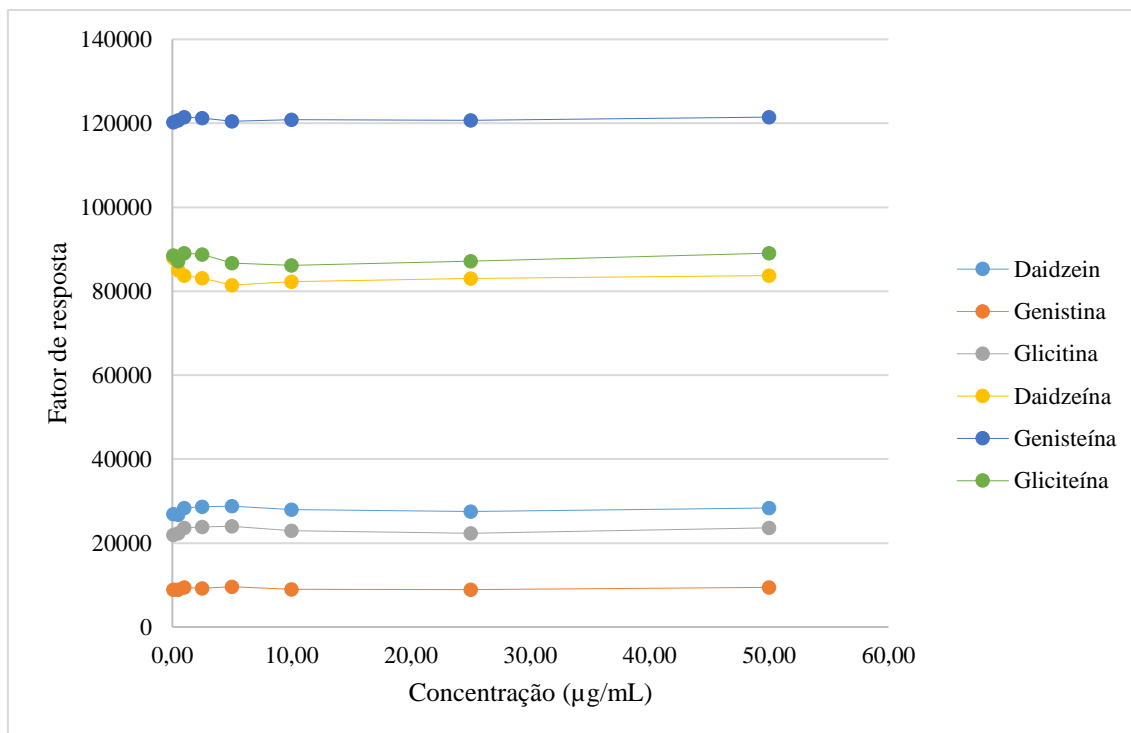


Figura 78: Gráfico do fator de resposta *versus* concentração do analito (µg/mL).

No gráfico da Figura 78 podemos verificar, mais uma vez, a linearidade do método de quantificação para faixa de concentração escolhida. Calculou-se os desvios padrão relativo entre os pontos, obtendo valores abaixo de 6,0%. Isto significa que o detector está reproduzindo os sinais com boa precisão para esta faixa de concentração, levando em consideração erros na preparação da amostra (erros de diluição), volume de injeção, integração dos picos e método de calibração.

6.2.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Com o software *Chromeleon* foi possível medir o ruído (μ_{Abs}) e o sinal (μ_{Abs}) proporcionado pelo detector ao passar um analito. O ruído foi obtido através de uma amostra em branco, enquanto o sinal através de uma solução padrão contendo todos os compostos numa concentração de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas amostras foram injetadas em triplicada no sistema cromatográfico, nas condições estabelecidas, obtendo uma média dos ruídos e dos sinais, relativo a concentração dos analitos. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados da seguinte forma:

$$LD = C \times \frac{3}{S_m/R_m} \qquad LQ = C \times \frac{10}{S_m/R_m}$$

Onde:

C = concentração do composto ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

S_m = média dos sinais obtidos (μ_{Abs}) ($n = 3$)

R_m = média do ruído (μ_{Abs}) ($n = 3$)

3 = a razão S/R mínima para um pico ser detectado com segurança

10 = a razão S/R mínima para um pico ser quantificado com segurança (SNYDER, 1997)

A Tabela 38 apresenta os valores estimados de LD e LQ da técnica para os compostos analisados nas condições de separação e quantificação estabelecidas. Os valores de LD e LQ estão de acordo com a sensibilidade de cada composto como pôde ser observado através das curvas analíticas.

Tabela 38: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *G. max* L.

Padrão	S_m/R_m	LD	LQ
Daidina	14,35	0,011	0,035
Glicitina	155,70	0,009	0,032
Genistina	32,60	0,004	0,015
Daidzeína	235,7	0,006	0,021
Gliciteína	170,9	0,008	0,029
Genisteína	14,42	0,016	0,035

Os LD variaram entre $0,004$ e $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os valores de LD mais baixos foram obtidos para o genistina ($0,004 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os valores de LD mais altos foram obtidos para daidzina e genisteína, com valores iguais a $0,011$ e $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Vale ressaltar, que os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

De acordo com Simões e colaboradores (2002), os compostos fenólicos são instáveis e facilmente oxidáveis. De fato, compostos fenólicos podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV. Esse fato, assim como o método extrativo aplicado e variações de genótipos, pode explicar a razão da baixa quantificação

(MAILLARD e BERSET, 1995). Santos e Blatt (1998) reforçam que variáveis como o clima, radiação solar, nutrição mineral, entre outros, podem também interferir no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários como os flavonoides e ácidos fenólicos

6.2.2.6 Precisão

A precisão (repetibilidade ou reprodutibilidade) mede o grau de incerteza de um método analítico surgido devido à dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos (BACCAN *et al.*, 2001). A repetibilidade indica a concordância dos resultados obtidos pelo mesmo método sob as mesmas condições (operador, equipamento, laboratório etc.) em um curto período. Da mesma forma, a reprodutibilidade indica a concordância de resultados individuais obtidos em diferentes condições (WELZ e SPERLING, 1999).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo admitidos valores superiores a 15% (BRASIL, 2002; ICH, 2005). O desvio padrão relativo é calculado pela razão entre desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) e a média dessas medidas (X_c), geralmente em porcentagem, conforme equação a seguir:

$$RSD\% = \left(\frac{S_c}{X_c} \right) \cdot 100$$

A precisão pode sofrer variações caso as réplicas sejam realizadas em diferentes laboratórios ou no mesmo laboratório, porém em diferentes períodos (WELZ e SPELING, 1999).

6.2.2.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução padrão ($0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$), executada por um mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período, conforme apresentado na Tabela 39.

Tabela 39: Dados de repetibilidade para os marcadores de *G. max*. L. na concentração de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Repetição	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
1	0,045	0,048	0,046	0,047	0,046	0,047
2	0,048	0,049	0,048	0,048	0,048	0,048
3	0,047	0,051	0,049	0,050	0,049	0,047
4	0,045	0,048	0,046	0,047	0,046	0,047
5	0,046	0,047	0,046	0,044	0,045	0,044
6	0,044	0,048	0,046	0,047	0,045	0,046
Média	0,046	0,049	0,047	0,047	0,047	0,047
DP	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,001
DPR (%)	3,2	2,8	2,7	4,3	3,8	2,9

Constatou-se neste trabalho, em todos os testes realizados, que o método, apresentou baixos percentuais de DPR, isto é, inferior a 15% (ANVISA, 2003; ICH, 1995), indicando uma boa repetitividade.

A metodologia proposta apresenta considerável precisão. Logo, o método proposto apresenta precisão suficiente para as substâncias fenólicas, capaz de proporcionar resultados próximos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (Anvisa, 2003; ICH, 1995).

É importante mencionar que produtos intermediários (extratos vegetais) são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como nos bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto a composição das matrizes biológicas. Desta forma, o DPR deve ser menor ou igual a 15% para aceitar uma curva de calibração, enquanto que para os métodos analíticos se aceita no máximo 5%.

Portanto, quanto mais próximos entre si estiverem os valores experimentais (menor amplitude), mais preciso será o método. Esta medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados dos ensaios (ANVISA, 2003).

6.2.2.6.2 Precisão intermediária

A precisão verificada para os padrões de *G. max* L. no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas Tabelas 40 e 41, respectivamente.

Tabela 40: Precisão intra-dia do método para quantificação dos marcadores de *G.max* L. por HPLC, na concentração de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

N	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
1	0,048	0,044	0,049	0,046	0,049	0,051
2	0,047	0,045	0,047	0,045	0,048	0,048
3	0,045	0,047	0,047	0,042	0,047	0,048
4	0,044	0,043	0,045	0,044	0,048	0,047
5	0,046	0,042	0,042	0,046	0,045	0,045
Média	0,046	0,044	0,046	0,045	0,047	0,048
DP	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002
DPR (%)	3,44	4,35	5,75	3,93	3,20	4,54

N = numero de análises realizadas; Valores expressos em concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

C_E = concentração encontrada.

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

Tabela 41: Precisão inter-dia do método para quantificação dos marcadores de *G. max* L. por HPLC, na concentração de 0,05 µg mL⁻¹

N	Daidzina		Glicitina		Genistina		Daidzeína		Gliciteína		Genisteína	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,048	0,046	0,044	0,047	0,049	0,046	0,046	0,048	0,049	0,049	0,051	0,049
2	0,047	0,044	0,045	0,046	0,047	0,046	0,045	0,047	0,048	0,047	0,048	0,047
3	0,045	0,046	0,047	0,046	0,047	0,045	0,042	0,045	0,047	0,046	0,048	0,046
4	0,044	0,045	0,043	0,044	0,045	0,044	0,044	0,046	0,048	0,046	0,047	0,046
5	0,046	0,044	0,042	0,043	0,042	0,043	0,046	0,044	0,045	0,045	0,045	0,045
Média	0,046	0,045	0,044	0,045	0,046	0,045	0,045	0,046	0,047	0,047	0,048	0,046
DP	0,002	0,001	0,002	0,002	0,003	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001
DPR (%)	3,44	2,22	4,35	3,57	5,75	2,74	3,93	3,05	3,20	2,86	4,54	2,89

Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey (p = 0,05).

N = numero de análises realizadas; Valores expressos em concentração (µg mL⁻¹).

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

6.2.2.7 Exatidão

Geralmente, os métodos de análise envolvem a transferência do analito de matrizes complexas para soluções mais simples, possibilitando, assim, a determinação instrumental. No entanto, este procedimento resulta, na maioria das vezes, em perda do analito ou em retenção de porções deste na própria matriz depois da extração, levando a uma quantificação errônea (THOMPSON *et al.*, 1999).

Diante do exposto, a recuperação do método deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a substância de interesse, o que pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI *et al.*, 2004).

Na Tabela 42, constam os dados obtidos por CLAE para os testes de recuperação da amostra, expressos em termos de porcentagem de recuperação.

Tabela 42: Recuperação das soluções padrão dos marcadores de *G. max* L. adicionadas às amostras e analisadas pelo método proposto (n=3)

Composto	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Adicionada	Encontrada	% Recuperação
Daidzina	0,05	0,048	96,00
	1,00	1,050	105,00
	5,00	4,850	97,00
	Média		99,33
Glicitina	0,05	0,047	94,00
	1,00	0,980	98,00
	5,00	5,030	100,60
	Média		97,53
Genistina	0,05	0,049	98,00
	1,00	1,090	109,00
	5,00	5,140	102,80
	Média		103,27
Daidzeína	0,05	0,057	114,00
	1,00	1,170	117,00
	5,00	5,230	104,60
	Média		111,87
Gliciteína	0,05	0,047	94,00
	1,00	1,120	112,00
	5,00	5,160	103,20
	Média		103,07
Genisteína	0,05	0,048	96,00
	1,00	0,910	91,00
	5,00	4,870	97,40
	Média		94,80

Observou-se neste estudo, que a recuperação para as substâncias fenólicas de interesse, foi na faixa de 91 a 117%. Os resultados se encontram dentro da faixa aceitável de recuperação, porém porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% é o desejável, mas, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata conforme a RE 899, 2003.

Para trabalhos que utilizaram extrato seco de *Passiflora incarnata* L., a média das recuperações da exatidão foi de 97,83% dentro da faixa aceitável de recuperação (Ziliotto *et al.*, 2012). Entretanto, Chabariberi (2009) mostrou que os flavonoides de *P. incarnata* L. e Passifloraceae, por espectrometria UV-Visível, tiveram valores de recuperação entre 70 e 120%, encontrando-se aceitáveis segundo os limites propostos (ICH, 1995).

Na validação de um método por Cromatografia Líquida para quantificar antocianinas em morango (*Fragaria spp.*), foram obtidas recuperações de 83 a 99%. Esses valores são considerados aceitáveis para a matriz estudada, devido à sua complexidade, segundo a AOAC (80-120% para alimentos) (AOAC, 2012).

Recuperações de 98-100% foram obtidas para flavan-3-óis, e ácidos hidroxibenzoicos hidroxicinâmicos, dihidrocalcones, flavonóis e flavonas, ao passo que as recuperações menores de 83% foram observadas para as flavanonas, o que foi atribuído às suas estruturas polares de baixo peso molecular. Estas substâncias menos polares tendem a ser mais solúveis em solventes não aquosos. Contudo, o método foi adequado para todas as classes de fenólicos presentes em frutas, exceto para flavanonas, baseada na Cromatografia Líquida para a determinação simultânea de várias famílias polifenólicas em sucos de frutas (ABAD-GARCÍA *et al.*, 2007).

Após validação verificou-se que o método apresenta especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

6.2.3 Espectrofotometria UV-VIS

Os espectros das substâncias utilizadas como marcadores químicos para análise de *G. max* L., foram obtidos em espectrofotômetro modelo Varian modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa de 200-800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1.0 cm e capacidade de 3 mL

Os espectros foram salvos como Comma-separated values (CSV) e exportados para o software OriginPro 8® para posterior análise de componentes principais.

A escolha da região de trabalho foi norteada pela inspeção dos espectros obtidos e informações da literatura referentes às bandas características no espectro dos compostos utilizados como marcadores químicos. a ocorrência de bandas fortes na região abaixo de 220 nm pode ser atribuída à absorção das enonas. De fato, a exemplo das enonas (cetonas a,b-insaturadas), esses compostos contêm em sua molécula o cromóforo C=C (em conjugação com o grupo C=O) que é responsável por uma absorção intensa, tipicamente entre 215-250 nm (SILVERSTEIN, 1994), associada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Por conseguinte, a faixa de comprimentos de onda entre 220 e 350 nm foi então escolhida para o tratamento quimiométrico dos dados.

Ao se observar os perfis espectrais das 6 amostras de *G. max* L. analisadas com adição do marcador químico (Figura 79a-f), percebeu-se que os espectros obtidos na região compreendida entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm trazem informações relevantes acerca das análises, sobre os marcadores, uma vez que esta é a faixa de absorção de tais amostras.

A análise dos espectros não apresentou problemas de variação sistemática da linha de base nem variações aleatórias associadas a ruídos nos dados. Sendo assim, não houve necessidade da realização de nenhum pré-processamento (correção de linha base, suavização, etc.) aplicado às amostras analisadas.

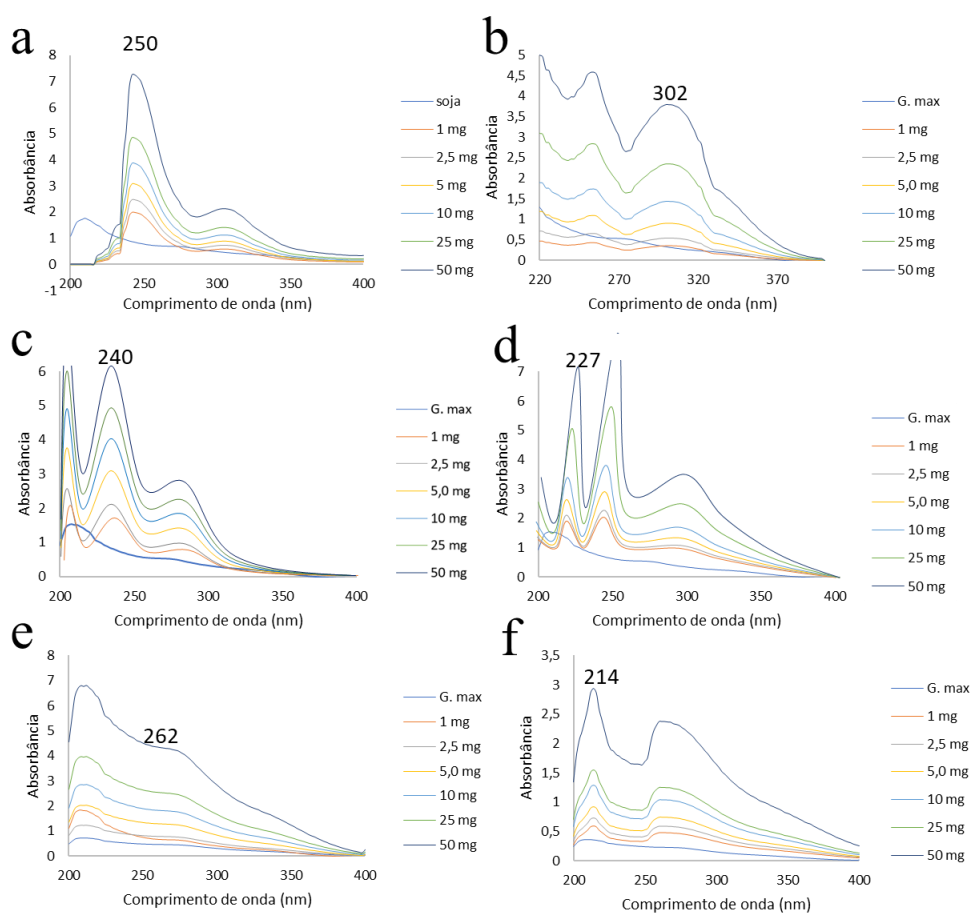


Figura 79: Espectros ultravioleta das amostras de *G. max* L. com adição de padrão interno na região de 200 a 400 nm. Em (a): Daidzina, (b): Glicitina, (c): Genistina, (d): Daidzeína, (e): Gliciteína e (f): Genisteína.

Observa-se que a adição de soluções de concentrações conhecidas dos marcadores utilizados incrementa o espectro no comprimento de onda característico de cada marcador

químico. A adição de marcador interno é de suma importância quando se trabalha com matrizes complexas. Dessa forma, a Figura 79 apresenta as curvas analíticas obtidas por UV-Vis e a Tabela 43 apresenta os coeficientes da curva analítica ($y = mx + b$), bem como o coeficiente de correlação, r^2 .

As curvas analíticas, mostradas na Figura 80, foram utilizadas para quantificação dos compostos presentes tanto nas amostras de *G. max* L comercializados no estado da Bahia quanto amostras de fitoterápicos.

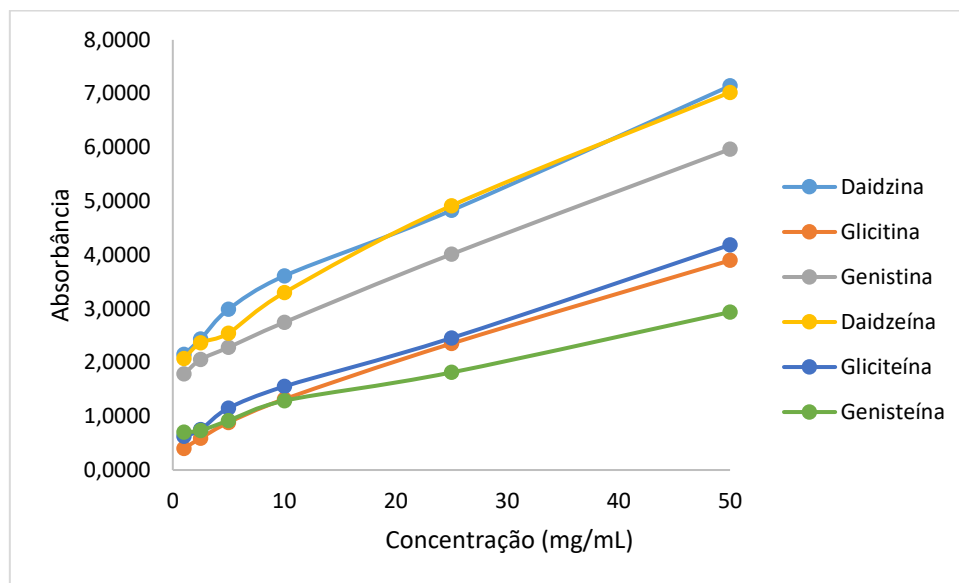


Figura 80: Curvas analíticas dos padrões de *G. max* L. obtidos por UV-vis com padronização interna.

A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade, uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações dos padrões presentes nas soluções, mostrando valores de coeficientes de correlação (r^2) próximos a 1.

Aplicada a regressão linear dos mínimos quadrados nas curvas analíticas, foi possível obter a equação da reta para cada analito. A Tabela 43 apresenta os valores, de "r", que indicam o coeficiente de correlação, "m" a sensibilidade e "b" a interseção da reta.

Tabela 43: Valores obtidos de "m", " b " e "r" através da regressão linear da curva analítica.

Composto	m	b	R²
Daidzina	0,0979	2,3341	0,9972
Glicitina	0,07	0,4837	0,9922
Genistina	0,0837	1,8362	0,9973
Daidzeína	0,1008	2,1327	0,9919
Gliciteína	0,0708	0,6842	0,9924
Genisteína	0,0452	0,6963	0,9928

Estes resultados indicam que a linearidade está dentro do intervalo de concentração testada para os padrões. A correlação dos dados observados na Tabela 43, apresentou um coeficiente de correlação superior a 0,98 para todas as substâncias padrões estudadas.

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório. A Tabela 44 sumariza os resultados das análises.

Tabela 44 Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *G. max L.* coletadas no estado da Bahia. *Gm* (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso e nas amostras de fitoterápicos.

Amostra	Concentração de isoflavonas em $\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão					
	Daidzina	Genistina	Glicitina	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína
Padrão	286 \pm 2	52 \pm 0,8	248 \pm 2,3	108 \pm 0,7	139 \pm 2,3	80 \pm 0,9
Gm 1	301 \pm 1	53 \pm 1,2	242 \pm 1,7	106 \pm 2	141 \pm 1,2	76 \pm 1,4
Gm 2	319 \pm 3	52,5 \pm 2	239 \pm 0,2	117 \pm 1,1	133 \pm 2,7	73 \pm 1,7
Gm 3	257 \pm 9	56 \pm 0,9	245 \pm 0,7	102 \pm 1,5	145 \pm 1,5	80 \pm 0,3
Gm 4	272 \pm 3	53,5 \pm 0,7	251 \pm 1,0	120 \pm 1,6	142 \pm 0,1	85 \pm 2,1
Gm 5	265 \pm 0,5	51,5 \pm 2,3	240 \pm 3,6	114 \pm 1,1	128 \pm 0,2	78 \pm 1,6
Gm 6	309 \pm 3	50,5 \pm 2,5	239 \pm 4,0	108 \pm 2,7	133 \pm 2,8	80 \pm 0,4
Gm 7	219 \pm 2	51 \pm 1,7	249 \pm 0,4	102 \pm 3,6	135 \pm 0,7	77 \pm 0,1
Gm 8	289 \pm 0,5	53 \pm 0,6	255 \pm 1,7	100 \pm 0,5	141 \pm 0,2	73 \pm 3,5
Gm 9	308 \pm 4	54,5 \pm 0,5	251 \pm 0,7	106 \pm 1,1	148 \pm 3,4	77 \pm 2,4
Gm 10	300 \pm 4	58 \pm 0,1	247 \pm 0,4	112 \pm 0,5	133 \pm 5,6	74 \pm 0,9
A_{Gm}	278 \pm 0,2	50 \pm 1	236 \pm 2,2	100 \pm 2,3	131 \pm 4	83 \pm 2
B_{Gm}	219 \pm 0,1	48 \pm 1,2	232 \pm 0,6	103 \pm 1,3	137 \pm 3,5	84 \pm 1,6
C_{Gm}	289 \pm 6	49 \pm 0,5	268 \pm 3	102 \pm 0,8	136 \pm 1,6	87 \pm 2,5
D_{Gm}	295 \pm 2,5	48 \pm 0,3	273 \pm 0,5	112 \pm 4,2	128 \pm 1,05	82 \pm 3,3
E_{Gm}	310 \pm 1,2	50 \pm 0,6	219 \pm 7	104 \pm 9	177 \pm 5	81 \pm 1

* *Gm* = *G. max L*

6.2.4 Aplicação da metodologia proposta.

Para aplicação da metodologia proposta, a Figura 81 apresenta os resultados obtidos para as análises de *G. max* comercializados em feiras livres do estado da Bahia. A análise da figura permite observar que há diferenças na concentração dos metabólitos entre as amostras estudadas (Tabela 45), bem como diferenças nos espectros,

O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reproduzíveis (CALIXTO, 2000). O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade (EWANS, 1994; CALIXTO, 2000).

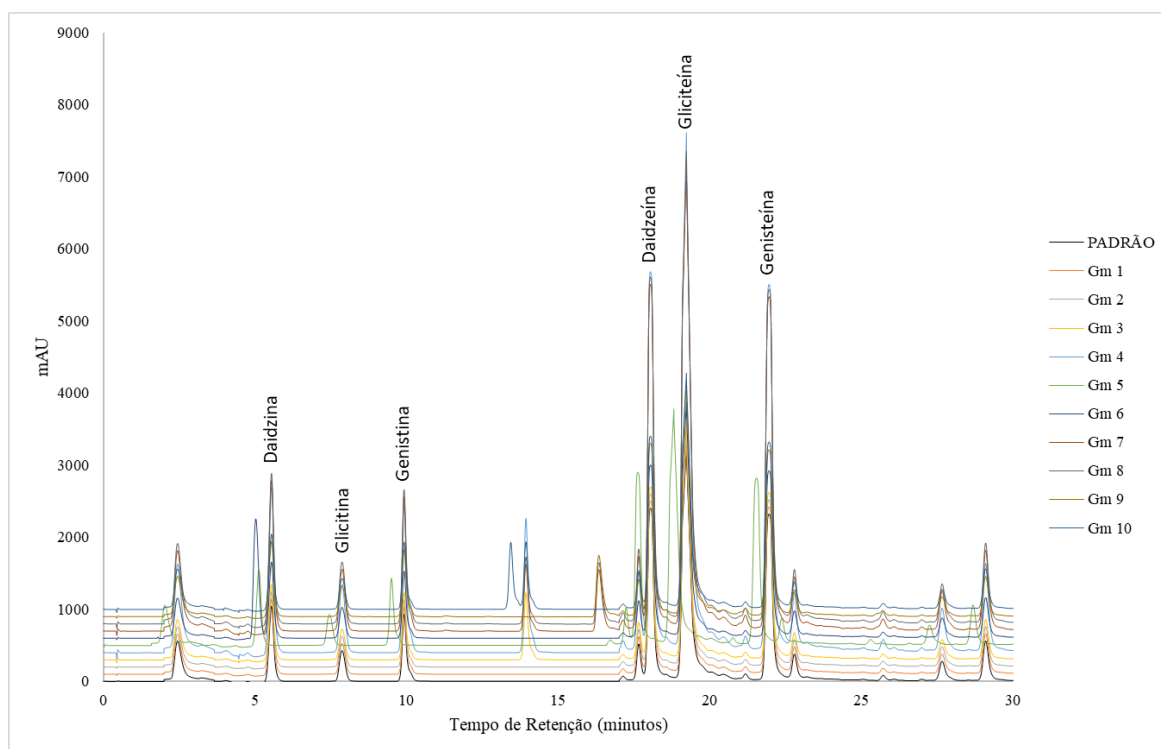


Figura 81: Cromatograma das amostras de *G. max* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso

Analisando a Figura 81, observa-se que todas as amostras apresentam os mesmos picos característicos da espécie vegetal. Todavia, as amostras Gm 3, Gm 4, Gm 7, Gm 8 e Gm 10 apresentaram um pico de retenção no t_r igual a 13,95. Por outro lado, a amostra Gm 10 apresenta outro pico de retenção em t_r 13,84. A diferença nesses espectros pode estar relacionada a diferentes tipos de culturas, safras, dentre outros.

Um estudo realizado por Carrão-Panizzi e colaboradores (1999), no sul do Brasil, demonstram que a concentração de isoflavonas é influenciada por fatores genéticos e ambientais. E verificaram que há diferenças nas concentrações das isoflavonas em diferentes tipos de culturas. E concluem que, a ingestão de alimentos com níveis mais elevados desses compostos poderia auxiliar no tratamento ou na prevenção do câncer de mama e próstata. Nesse caso, os estados do sul do Brasil, onde as temperaturas são mais baixas e as concentrações desses compostos são maiores, seriam mais adequados para a produção de soja visando o uso no desenvolvimento da medicina. Por outro lado, as cultivos de soja com reduzida concentração de isoflavonas ocorrem em locais de temperaturas mais altas (baixas latitudes).

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas antes de 28 dias, prazo recomendado (STANDARD METHODS, 1997).

A Tabela 45 sumariza o resultados das análises.

Tabela 45: Concentração de isoflavonas em amostras de *G. max* comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

Amostra	Concentração de isoflavonas em $\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão					
	Daidzina	Genistina	Glicitina	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína
Padrão	300 \pm 5	55 \pm 0,9	250 \pm 18	120 \pm 7,7	140 \pm 11	80 \pm 0,9
Gm 1	312 \pm 4	58 \pm 0,6	245 \pm 1,4	122 \pm 0,4	143 \pm 0,6	76 \pm 0,4
Gm 2	326 \pm 9	51 \pm 0,2	240 \pm 3,2	119 \pm 1,1	135 \pm 2,9	77 \pm 0,7
Gm 3	278 \pm 11	56 \pm 1,0	255 \pm 0,7	120 \pm 0,5	148 \pm 1,6	82 \pm 1,3
Gm 4	276 \pm 4	59 \pm 0,3	246 \pm 2,2	118 \pm 0,6	140 \pm 3,1	81 \pm 0,1
Gm 5	275 \pm 1	53 \pm 0,4	240 \pm 3,6	115 \pm 1,3	136 \pm 0,2	80 \pm 0,6
Gm 6	312 \pm 3	52 \pm 1,2	242 \pm 4,0	116 \pm 0,7	139 \pm 5,8	79 \pm 0,4
Gm 7	226 \pm 6	55 \pm 0,4	252 \pm 0,4	128 \pm 3,6	137 \pm 4,7	77 \pm 1,1
Gm 8	287 \pm 11	57 \pm 0,8	253 \pm 1,7	124 \pm 0,9	145 \pm 0,2	78 \pm 0,5
Gm 9	312 \pm 8	56 \pm 0,1	249 \pm 0,7	120 \pm 2,1	143 \pm 2,6	74 \pm 0,4
Gm 10	302 \pm 5	54 \pm 0,7	248 \pm 0,4	121 \pm 0,1	137 \pm 0,2	75 \pm 0,9

* Gm = *Glycine max*

Os produtos à base de soja analisados diferem quanto à fonte das isoflavonas. As fontes de isoflavonas mais comuns são o gérmen de soja ou o extrato concentrado de soja. Essas diversas origens das isoflavonas são importantes de serem consideradas, já que delas vai depender o conteúdo e perfil de isoflavonas presentes nos produtos.

As isoflavonas se concentram no hipocótilo (erroneamente denominado gérmen) da semente de soja, sendo encontradas quantidades até dez vezes maiores que no cotilédone, e cerca de cem vezes maiores que na casca. No entanto, como o cotilédone corresponde a 90% da semente e o hipocótilo a apenas 2%, a maior contribuição em termos de isoflavonas para o grão é do cotilédone, o que justifica a utilização de extratos concentrados obtidos a partir do grão de soja como fonte de isoflavonas. A utilização do gérmen ou de extrato concentrado de soja resulta em produtos com diferenças em sua composição em relação ao perfil das isoflavonas, já que no hipocótilo encontram-se basicamente daidzina e glicitina, enquanto que no cotilédone há 20 vezes mais genistina que no hipocótilo (ELDRIDGE e KWOLEK, 1983).

Os extratos secos de *G. max* utilizados como matéria-prima para a fabricação de amostras comerciais são padronizados para conter no mínimo 40% de isoflavonas totais, não sendo padronizada a quantidade e o tipo de cada isoflavona (CLAPAUCH *et al.*, 2002). Neste contexto, a genisteína é considerada como sendo a isoflavona com maior atividade biológica dentre as demais, quando comparada aos efeitos do 17-- β -estradiol (DIXON e FERREIRA, 2002). Portanto seu conteúdo nos extratos é de grande relevância no contexto farmacológico e através de sua determinação é possível prever um maior ou menor efeito terapêutico.

A Tabela 46 apresenta a análise de cinco amostras comerciais de *G. max* comercializadas em Salvador – Bahia, Brasil. E a Tabela 47 apresenta a variação em percentagem das análises comparadas ao declarado pelo fornecedor.

Tabela 46: Concentração de isoflavonas em amostras comerciais de *G. max* comercializadas em Salvador – Bahia, Brasil.

Concentração de isoflavonas em $\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão						
Amostra	Daidzina		Genistina		Glicitina	
	Encontrado	%	Encontrado	%	Encontrado	%
A_{Gm}	289 \pm 2,0	12,57	45 \pm 1	1,96	232 \pm 2,9	10,09
B_{Gm}	290 \pm 3,2	12,57	48 \pm 0,2	2,09	268 \pm 1,7	11,65
C_{Gm}	301 \pm 1,4	12,57	46 \pm 3	2,00	274 \pm 1,6	1,04
D_{Gm}	322 \pm 0,2	12,57	42 \pm 2,4	1,83	212 \pm 3,5	9,22
E_{Gm}	275 \pm 1,5	12,57	49 \pm 0,5	2,26	249 \pm 1,2	10,83
Amostra	Daidzeína		Gliciteína		Genisteína	
	Encontrado	%	Encontrado	%	Encontrado	%
A_{Gm}	101 \pm 2	4,39	134 \pm 3,6	5,83	83 \pm 1	3,61
B_{Gm}	98 \pm 1	4,26	133 \pm 4,5	5,78	85 \pm 0,5	3,70
C_{Gm}	99 \pm 2,3	4,30	139 \pm 2,1	6,04	86 \pm 1,4	3,74
D_{Gm}	97 \pm 0,5	4,22	131 \pm 6,9	5,70	83 \pm 0,8	3,61
E_{Gm}	99 \pm 1,7	4,30	135 \pm 0,7	5,87	84 \pm 6,4	3,65

Tabela 47: Comparação percentual dos teores de isoflavonas em amostras comerciais de *G. max* L.

Amostra	Valor declarado (%)	Valor encontrado (%)	Variação (%)
A_{Gm}	40	38,43	-1,57
B_{Gm}	40	40,04	0,04
C_{Gm}	40	29,70	-10,30
D_{Gm}	40	37,13	-2,87
E_{Gm}	40	39,48	-0,52

A análise da Tabela 46 e 47 mostra que há variações em relação a quantidade dos metabólitos presentes nas amostras analisadas. As diferenças encontradas para os produtos comerciais variaram entre 0,04% (produto A_{Gm}) e – 10,30% (produto C_{Gm}), em relação aos metabólitos presentes. Dessa forma, as cápsulas produzidas com C_{Gm} apresentarão valores abaixo do especificado no rótulo. Tais dados, refletem diretamente o consumidor, uma vez que a eficiência da terapia é condizente com a dose terapêutica do medicamento fitoterápico. Análises mais refinadas, tentando identificar a origem da planta, fatores sobre plantio e processamento são necessários para averiguar a diferença de concentração.

O teor de isoflavonas da soja difere de acordo com a variedade e com as condições climáticas e do solo. A análise de 210 cultivares de soja plantados em Dakota do Sul (E.U.A.) mostrou teores de isoflavonas entre 116 e 274 mg por 100 g (WANG *et al.*, 2000).

Eldridge e Kwolek (1983) também encontraram variação, entre 46 e 195 mg por 100 g, para a mesma variedade cultivada em diferentes regiões. Ainda, a mesma variedade cultivada na mesma região apresentou variação no conteúdo de isoflavonas de um ano para o outro, entre 118 e 331 mg isoflavonas por 100 g (WANG e MURPHY, 1994), o que foi atribuído a fatores climáticos e ambientais.

Essas variações dos teores de isoflavonas da soja mostram a inadequação da utilização de valores médios obtidos para a soja para o cálculo do teor de isoflavonas do produto final. Além disso, em nenhum dos rótulos dos produtos analisados está especificada a forma de se expressar o conteúdo total de isoflavonas, ou seja, se a massa total foi calculada a partir da soma da massa dos derivados glicosilados mais os derivados glicosilados e esterificados mais as agliconas, ou se refere a resultados normalizados para

massa equivalente das respectivas agliconas. Resultados expressos na forma de derivados glicosilados superestimariam os teores de isoflavonas já que o seu peso molecular é quase o dobro do das agliconas. Como as formas que são absorvidas são as agliconas, o recomendável para expressar o conteúdo de isoflavonas dos produtos comerciais é normalizar os resultados para massa das agliconas e/ou apresentar as quantidades molares das isoflavonas (SONG *et al.*, 1998; NURMI *et al.*, 2002).

6.2.5 Análises Estatísticas

A análise baseada no perfil cromatográfico (“*fingerprint*”) utilizando marcadores químicos para avaliação da qualidade das matérias-primas à base de plantas está sendo cada vez mais utilizado, porém variações naturais no material de partida torna a comparação um tanto ambígua. (MOK *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2004).

Na pesquisa quimiométrica inicial, os dados cromatográficos eram comumente transformados primeiro em matrizes de dados de tempo de retenção - área de pico, incluindo apenas picos selecionados, independentemente de a identidade dos picos ser conhecida ou não. Os dados assim obtidos foram então usados para fazer o processamento, isto é, o cálculo da similaridade ou dissimilaridade entre as impressões digitais e a análise de componentes principais (WOLD *et al.*, 1987; MARTENS e NAES, 1991; ZHANG *et al.*, 2003).

No entanto, conforme apontado por Nielsen (1998), “A qualidade dos dados (incluindo apenas os dados de tempo de retenção - área de pico) depende da detecção de pico (integração) e de como os picos são selecionados para a análise de dados. Pode ser muito difícil selecionar um conjunto ideal de parâmetros de integração para cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras complexas que contenham facilmente mais de 100 picos. Além disso, a seleção e extração de picos para incluir na análise de dados é difícil, em parte subjetiva e uma grande quantidade de dados nos cromatogramas são descartados. As desvantagens da detecção e integração dos picos e da introdução de uma seleção subjetiva de pico podem ser evitadas usando todos os pontos de dados coletados na análise quimiométrica”. Assim, seguindo a sugestão da Nielsen, todos os perfis cromatográficos foram utilizados para realizar a análise quimiométrica direta.

A análise pode ser feita facilmente com a ajuda de técnicas adequadas de compressão de dados, como a técnica de *wavelet* ou transformação de Fourier (ZUPAN

et al., 1988; WALCZAC *et al.*, 1997; CHAU *et al.*, 1996) se necessário. Além disso, outra vantagem de levar todo o perfil cromatográfico para realizar a análise quimiométrica direta é que a forma do pico pode ser incluída na análise de dados, o que tornará o pré-tratamento de picos sobrepostos muito mais fácil quando se faz uma avaliação das impressões digitais. É evidente que os perfis cromatográficos devem ser adequadamente alinhados para compensar desvios menores nos tempos de retenção antes de se fazer a avaliação de impressões digitais e a análise quimiométrica para fins de controle de qualidade (LIANGA *et al.*, 2004).

O termo quimiometria tem sido usado desde a década de 1970 para descrever a aplicação de métodos matemáticos (geralmente estatísticos) de análise em dados químicos (MASSART *et al.*, 2003). Técnicas estatísticas como análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de cluster (HCA) é comumente usada em quimiometria, pois ajuda a reduzir muito a complexidade dos perfis cromatográficos para uma forma mais amigável, como um gráfico bidimensional (LAVINE, 2006).

O PCA (análise dos componentes principais) funciona explicando um grande número de variáveis altamente correlacionadas, como várias medições de altura de pico, usando um pequeno número de variáveis não correlacionadas, chamadas de componentes principais (PCs) (KONG *et al.*, 2009). Plotar as amostras nos PCs pode resultar em gráfico de 1, 2 ou 3 dimensões dependendo do número de PCs escolhidos. Amostras similares costumam se agrupar na mesma área do gráfico de pontuação.

Técnicas baseadas em HCA (Análise de componentes hierárquicos) podem ser usadas em conjunto com o PCA para auxiliar na classificação de grupos de amostras (KONG *et al.*, 2009). Por exemplo, o agrupamento de vizinhos mais próximos (KNN), por exemplo, pode ser usado para categorizar amostras em um número de grupos definido pelo usuário.

6.2.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

Utilizando o conteúdo de seis isoflavonas em 11 amostras de *G. max* L. como variável de agrupamento, o HCA dos dados padronizados foi realizado com a distância euclidiana e o agrupamento de ligação de Ward pelo software Origin. O dendograma mostrado na Figura 82 ilustrou claramente que todas as amostras poderiam ser categorizadas em três grupos com Grupo 1 (G1) contendo a amostra padrão, Gm 3, Gm 4, Gm 5 e Gm 8, Grupo 2 (G2) contendo Gm 1, Gm 2, Gm 6, Gm 9 e Gm 10, e Grupo 3

(G3) contendo Gm 7, respectivamente. Tais diferenças podem estar relacionadas a cultivos diferentes de *G. max* no estado da Bahia ou de importações de outros estados, bem como a mistura de cultivos numa mesma amostra adquirida, uma vez que comerciantes agrupam os lotes para evitar perdas. Todavia, é de grande importância que haja controle rígido no material vegetal bruto a partir da fonte, um bom processo de agricultura e o sistema de avaliação da qualidade, especialmente para ervas que são utilizadas na atenção primária a saúde.

Os resultados mostraram que o HCA pode classificar a similaridade de *Glycine max* L. com base no conteúdo dos seis componentes. No entanto, o HCA não conseguiu indicar claramente qual grupo tinha alta qualidade. Portanto, a análise de plotagem de radar foi usada na análise de qualidade.

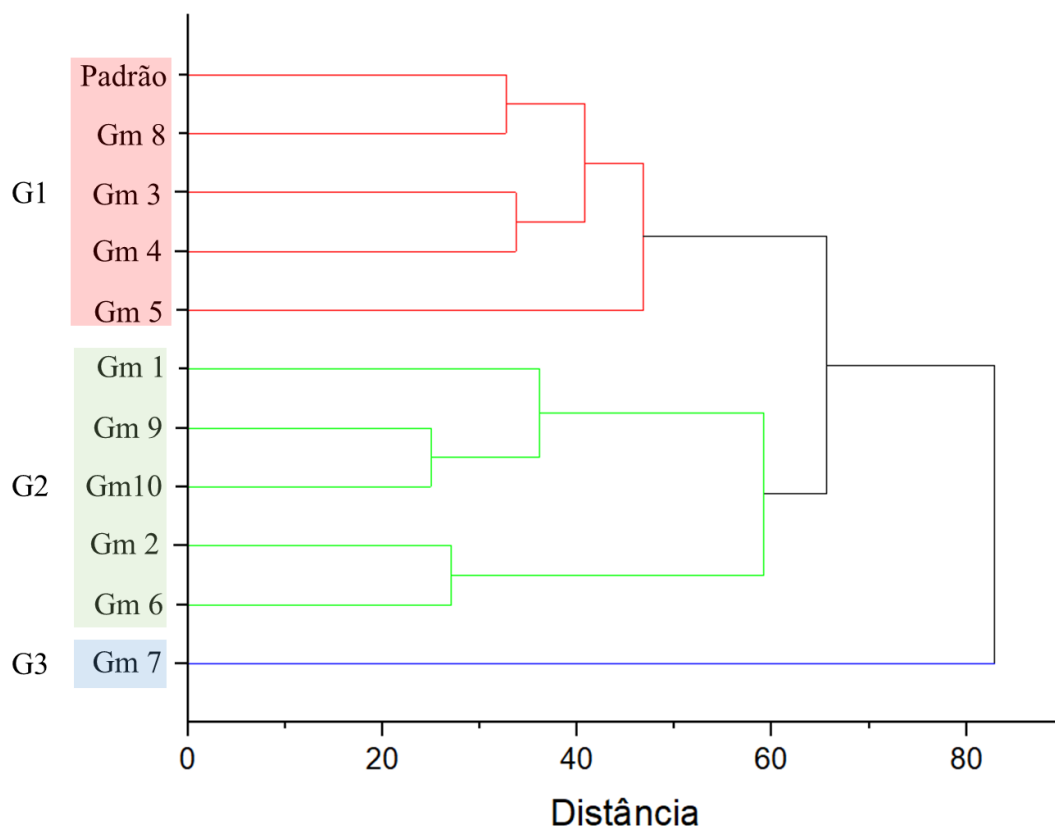


Figura 82: Dendrograma de seis composições químicas para 11 amostras de *G. max* L.. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3.

6.2.5.2 Análise de plotagem de radar

Um gráfico de radar foi usado para avaliar a qualidade das amostras de *G. max* L. por causa de sua discriminação simples, rápida e rotineira. Para facilitar a comparação, o

gráfico de radar foi empregado para classificar preliminarmente as amostras de *G. max* L. com base no conteúdo dos seis componentes. Análises de tramas de radar foram realizadas em 11 amostras de *G. max* L. comercializadas no estado da Bahia.

A Figura 83a mostra as médias dos seis componentes em G1-G3 no HCA. Como mostrado, as distribuições dos seis componentes das amostras *G. max* L. de vários grupos exibiram padrões característicos diferentes. As amostras do G2 apresentaram um conteúdo distintamente menor dos seis componentes e foram facilmente discriminadas em comparação com as amostras de *G. max* L. dos outros dois grupos. As diferenças entre gliciteína e genistina eram significativas. Dessa forma, esses dois componentes podem ser os principais fatores que causam a variação das amostras estudadas. Portanto, a análise de plotagem de radar poderia distinguir a qualidade das diferentes amostras de *G. max* L.

Como mostrado na Figura 83b, a distribuição dos padrões de composição química apresentou características semelhantes. Este achado indicou que as amostras de *G. max* L. das várias localidades tinham características semelhantes devido à hereditariedade da espécie. No entanto, a medição visual foi o único resultado recebido pela análise de plotagem de radar, e a falta de indicadores claros descrevendo as distinções exatas reduziu a confiabilidade dos resultados. Portanto, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada nos estudos a seguir.

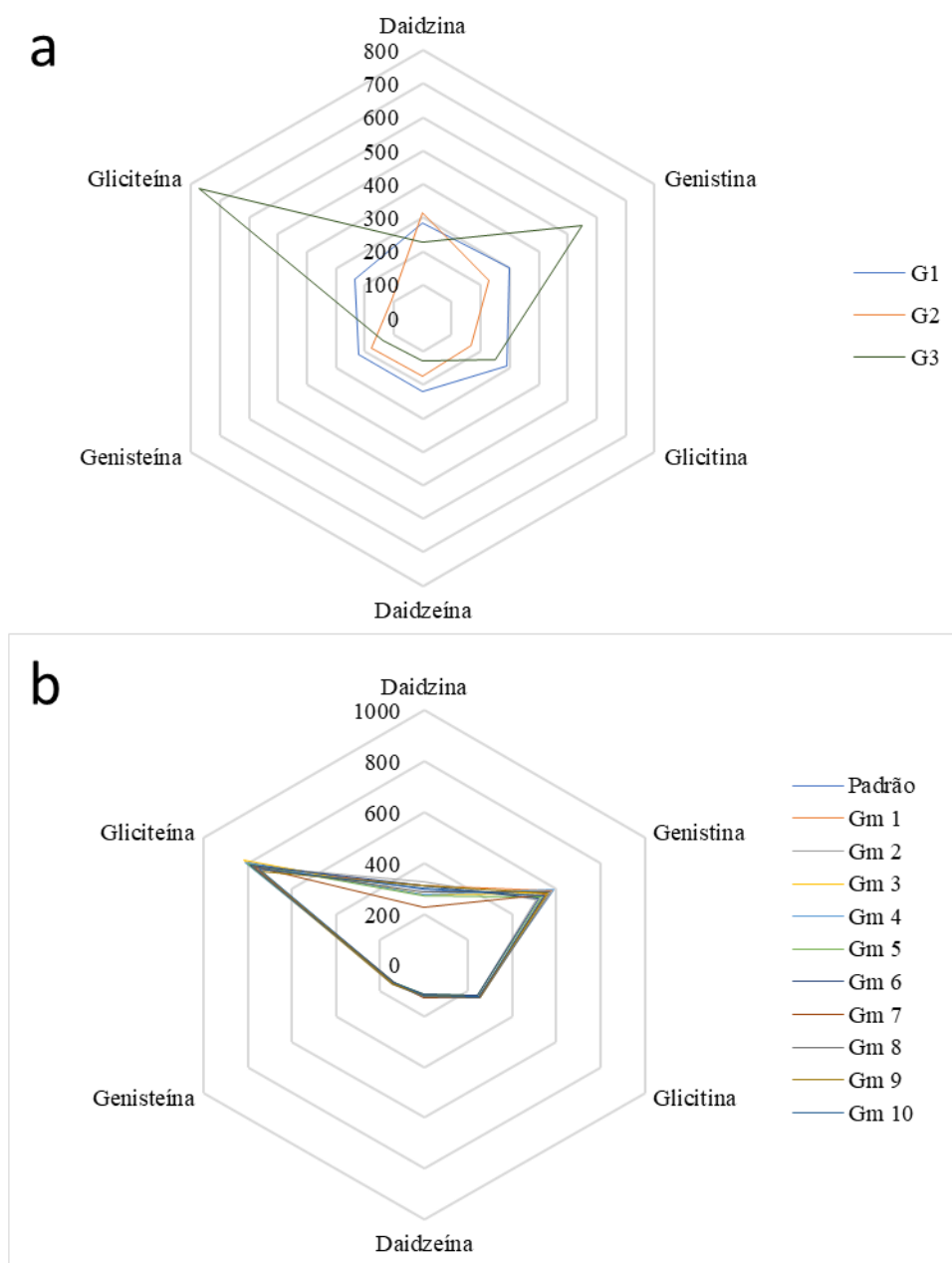


Figura 83: Gráficos de radar mostrando a diferença de origens geográficas em termos de seis componentes em várias amostras de *G. max* L.; (a) G1, G2 e G3. (b) A distribuição da composição química de 11 amostras de *G. max* L.

6.2.5.3 Análise de dos componentes principais (PCA)

Para avaliar o teor dos elementos em estudo, a distribuição dos mesmos nas matrizes analisadas, dentre outros aspectos, realizou-se a análise de componentes principais utilizando o programa Origin. Organizou-se uma matriz (198x6), em cujas

linhas e colunas foram dispostas as concentrações de cada replicata e as variáveis (analitos), respectivamente, totalizando 198 valores de concentração referentes a 6 marcadores de interesse.

Os valores dessa matriz de dados foram autoescalados, a fim de padronizar suas ordens de grandeza em um mesmo nível, permitindo a análise estatística dos dados.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 48, observa-se que as três primeiras componentes principais formadas (PC1 45,91 %; PC2 22,99 % e PC3 19,79 %) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas três componentes juntas permitem explicar 88,69 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

A Figura 84 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os quatro primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

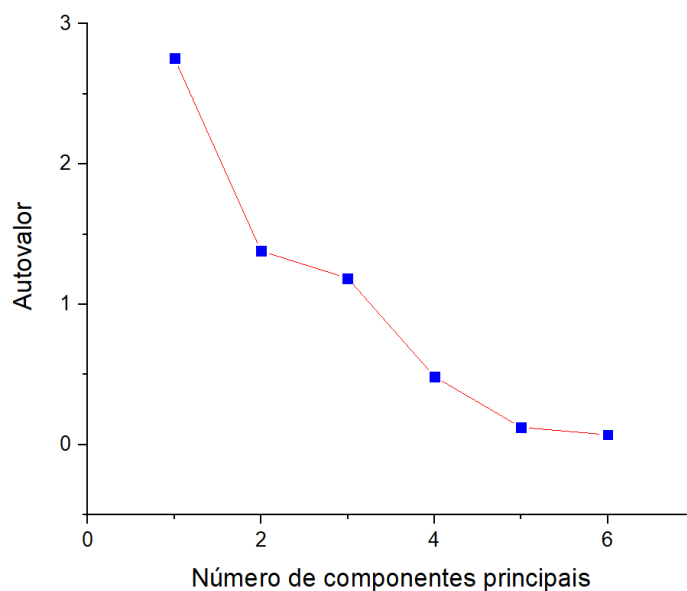


Figura 84: Gráfico de autovalor *versus* numero de componentes principais.

Tabela 48: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	2,75452	45,91%	45,91%
2	1,37964	22,99%	68,90%
3	1,18709	19,78%	88,69%
4	0,4856	8,09%	96,78%
5	0,12308	2,05%	98,83%
6	0,07007	1,17%	100,00%

A Tabela 49 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 49: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2	PC3
Daidzina	-0,3469	0,2497	0,6585
Genistina	0,4475	0,2509	0,2065
Glicitina	0,5617	-0,0467	0,0621
Daidzeína	0,4227	-0,5724	0,0166
Genisteína	0,4212	0,4551	0,3538
Gliciteína	0,0876	0,5810	-0,6279

Os maiores pesos são observados para a variáveis Gliciteína, na primeira componente principal, responsáveis por explicar a maior variância dos resultados nesse fator. Já a variável Daidzeína e Gliciteína apresenta maior peso em PC 2, enquanto que o Daidzina e Gliciteína é a variável de maior peso em PC 3. É sabido que a grandeza dos pesos é avaliada assumindo seus valores numéricos em módulo

6.2.5.3.1 Análise de PC1 x PC2

Obteve-se os gráficos de pesos (Figura 85) e escores (Figura 86) para a análise de PC1 x PC2. A partir da análise da Figura 85, evidencia-se que é possível a separação de Daidzina dos demais compostos, enquanto através da componente principal 2, é possível

separar os compostos daidzeína e gliciteína dos demais, uma vez que ambos apresentam valores negativos.

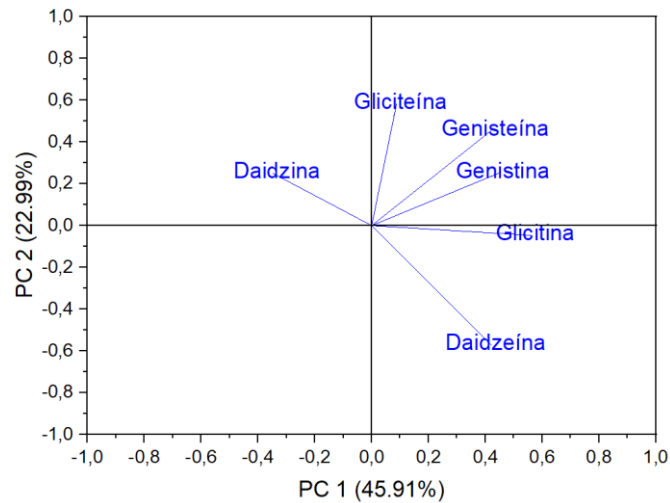


Figura 85: Gráfico de pesos PC1 x PC2

Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, nota-se a formação de três grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pelas amostras Gm 1, Gm2, Gm 6, Gm 9 e Gm 10, um segundo grupo composto pelas amostras Gm 3, Gm 4, Gm 5, Gm 8 e padrão e um terceiro grupo formado pela amostra Gm 7..

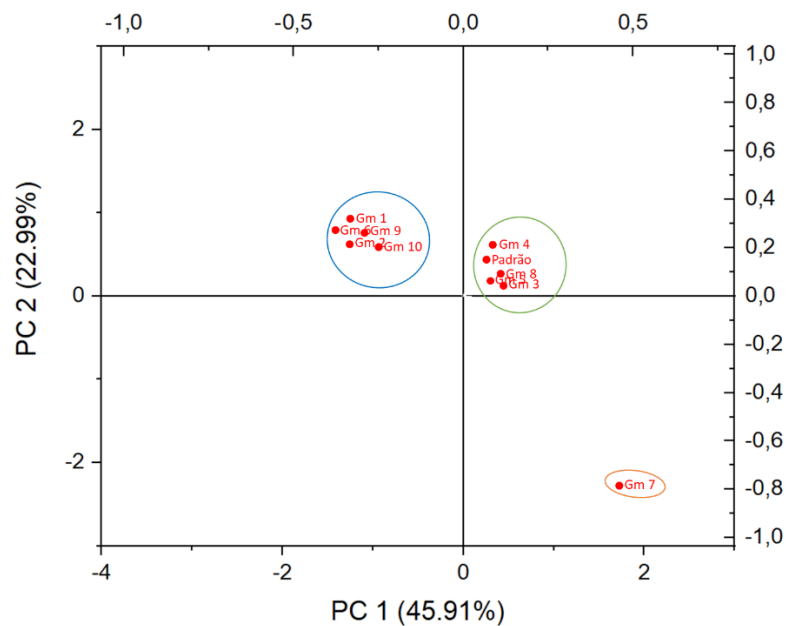


Figura 86: Gráfico de escores PC1 x PC2

Conforme evidenciado na Figura 86, de acordo com PC2, o grupo formado pela amostra Gm 7 apresenta maior concentração de Daidzeína em relação às outras amostras. As amostras Gm 1, Gm2, Gm 6, Gm 9 e Gm 10 apresentam maior concentração de daidzina quando comparado às outras amostras. Ao centro do gráfico de escores, ainda na Figura 85, o grupo formado pelas demais amostras – Gm 3, Gm 4, Gm 5, Gm 8 e padrão - exibe menor teor de todos os elementos químicos determinados. De fato, pode-se concluir que as amostras Gm 3, Gm 4, Gm 5, Gm 8 estão mais relacionadas, em termos de concentração de metabólitos com a amostra padrão.

6.2.5.3.2 Análise de PC1 X PC3

A terceira componente principal explica 17,97% da variância dos dados. Analisou-se o comportamento das amostras através de PC1 x PC3, de acordo com as Figura 87 (gráfico de pesos) e Figura 88 (gráfico de escores).

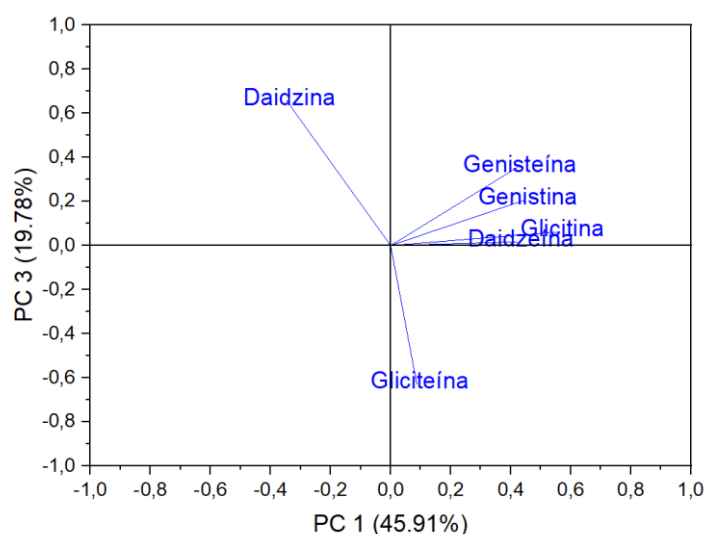


Figura 87: Gráfico de pesos PC1 x PC3.

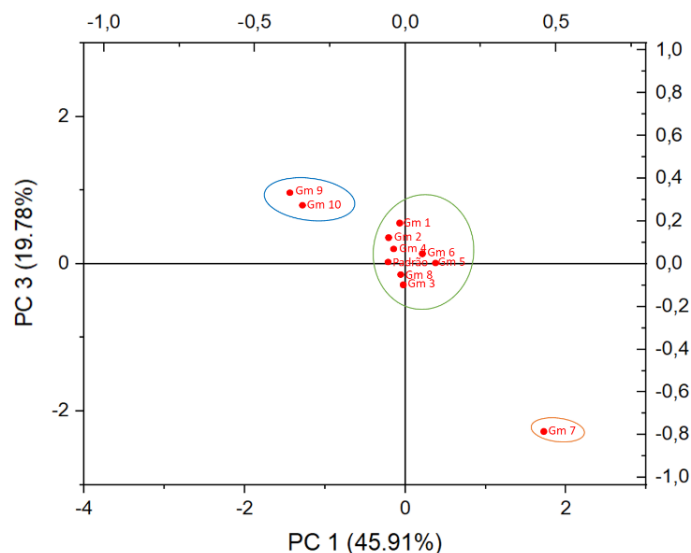


Figura 88: Gráfico de escores PC1 x PC3.

O grupo formado pela Amostra Gm 7 aparece isolado dos demais, apresentando maiores concentrações de Daidzeína, de acordo com PC1, confirmando a mesma segregação encontrada na análise de PC1 x PC2. Além disso, as demais amostras, agrupadas ao centro, expressam menores concentrações de todos os analitos, como evidenciado nos gráficos de pesos e escores.

6.2.5.3.2 Análise de PCA tridimensional

Além da análise clássica da PCA, é possível a plotagem de gráfico usando tres componentes principais e assim possibilitar uma visão tridimensional da dispersão dos pontos, conforme Figura 89. O *software* utilizado permite a plotagem tridimensional e também possibilita a rotação do conjunto de dados do gráfico, sendo possível visualizar a distribuição dos pontos sob diversos angulos, tornando possível observar a melhor posição onde os pontos de uma amostra de *Glycine max L.* encontram-se separados dos pontos de outra amostra. Dessa forma, aumentam as possibilidades de encontrar pontos no espaço que nos permitem verificar a correlação ou a discrepância entre as amostras analisadas.

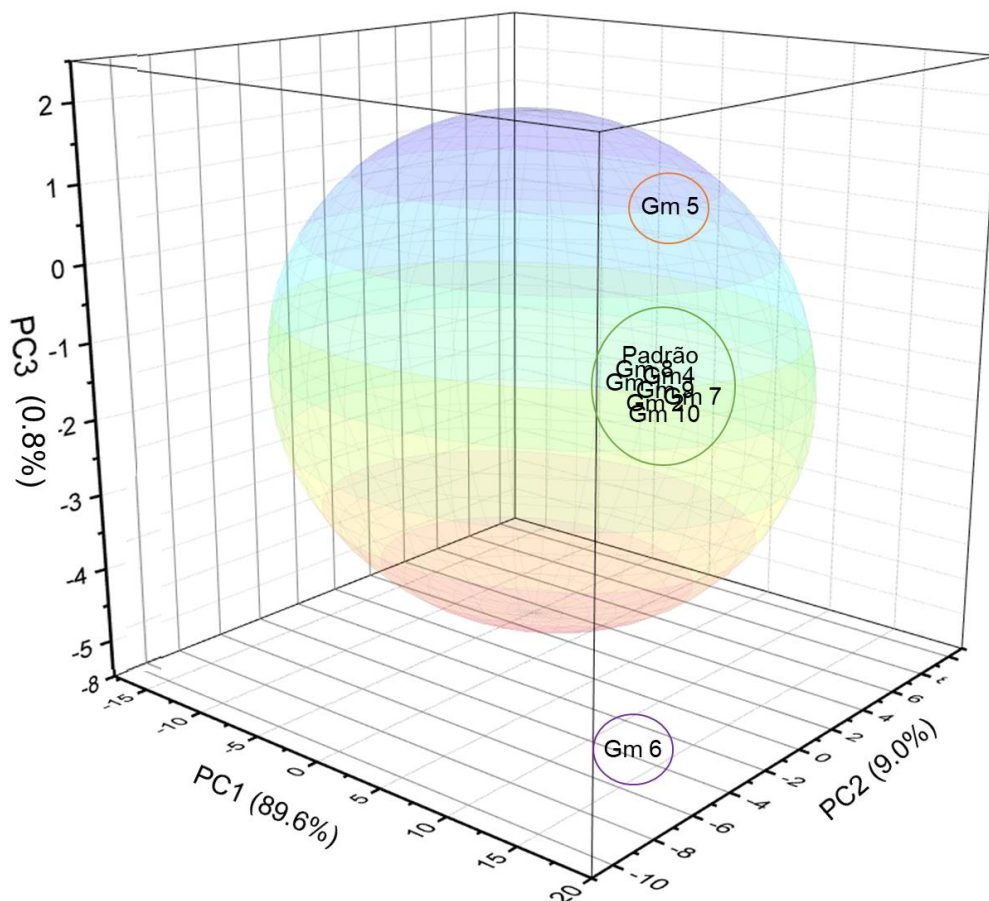


Figura 89: PCA das amostras de *G. max L.* apresentadas num gráfico tridimensional com a presença de três componentes principais. O círculo central apresenta a confiabilidade de 95%.

6.2.6 Avaliação da metodologia

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre o método proposto, para a metodologia desenvolvida nesse trabalho, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos da repetibilidade para os métodos propostos, utilizando o Teste *t* de Student e ANOVA (análise de variância), presumindo variâncias equivalentes e comparando-os com os resultados obtidos com a análise por UV-vis (QUINTELA et al., 2010). Além disso, a comparação também foi realizada através de análise da PCA em ambas metodologias, bem como através de análise por LC-MS.

A análise por LC-MS pode ser verificada no apêndice C. Embora possa haver correspondência entre as análises, discrepâncias foram encontradas devido a utilização de outro equipamento e outra coluna cromatográfica.

Os resultados do teste t para as análises realizadas por UV-vis e comparadas com HPLC são apresentados na Tabela 50.

Tabela 50: Teste t pareado para a determinação dos marcadores químicos de *G. max L.* por HPLC e por espectrofotometria UV-vis.

	HPLC	UV
Média	155,4090909	151,2348485
Variância	7650,891608	7540,647844
Observações	66	66
Correlação de Pearson	7595,769726	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	130	
Stat t	0,275136838	
P(T<=t) uni-caudal	0,39182396	
t crítico uni-caudal	1,656659413	
P(T<=t) bi-caudal	0,048364792	
t crítico bi-caudal	1,978380405	

Pode-se observar que em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada (0,96). Os resultados do Teste t de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$ (Tabelas 50), demonstraram não haver diferença significativa entre a metodologia proposta em comparação a metodologia por espectrofotometria UV-Vis.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a quantificação dos marcadores químicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 51

Tabela 51: Análise da variância (ANOVA) das determinações da concentração dos marcadores por HPLC e UV-Vis.

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	P - Valor	F de significação
Entre grupos	1	575,00189	575,0018	0,075700	0,0364792*	3,91398
Dentro dos grupos	130	987450,06	7595,769			
Total	139	348,8031				

* Significativo para $\rho < 0,05$

O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,036 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. De fato, o valor de F calculado (0,075700) é menor que o valor de F crítico (3,91398). A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabelas 51) demonstrou que não haver diferenças significativas entre as metodologias ($\rho = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias evidenciam que não há diferenças entre as metodologias, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a metodologia proposta é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *G. max*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 52, observa-se que as três primeiras componentes principais formadas (PC1 36,31%; PC2 21,26%, PC3 18,22%) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas três componentes juntas permitem explicar 74,83% da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

A Figura 90 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os quatro primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

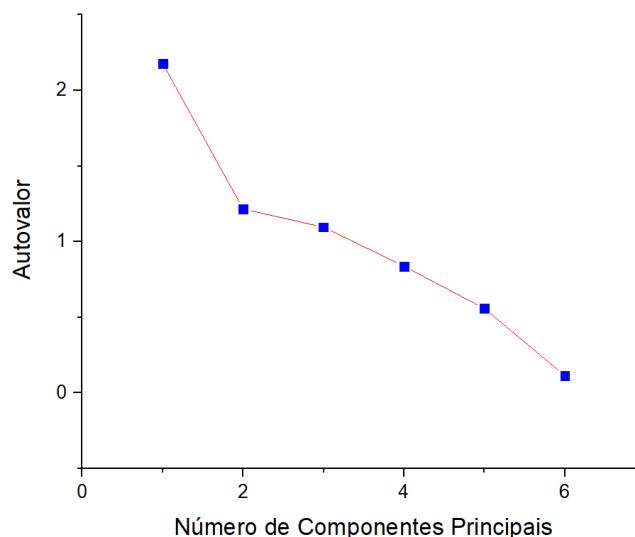


Figura 90: Gráfico de autovalor *versus* número de componentes principais.

Tabela 52: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	2,17877	36.31%	36.31%
2	1,21539	20.26%	56.57%
3	1,09553	18.26%	74.83%
4	0,83749	13.96%	88.79%
5	0,5581	9.30%	98.09%
6	0,11472	1.91%	100.00%

A Tabela 53 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 53: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2	PC3
--	-----	-----	-----

Daidzina	-0,26114	0,73981	0,01734
Glicitina	0,47087	0,19894	0,25595
Genistina	0,50416	0,04823	-0,4625
Daidzeína	0,17576	0,43868	0,57248
Gliciteína	0,55669	0,24069	-0,30411
Genisteína	0,33929	-0,4005	0,54778

A partir dos valores encontrados de cada marcador em cada metodologia, realizou-se a análise por PCA e obteve-se os gráficos PC1 x PC2 (Figura 89) e PC1 x PC3 (Figura 90). A partir da análise das Figuras 90 e 91, evidencia-se que não há diferenças discrepantes entre as análises, uma vez que as mesmas se agruparam conjuntamente. Além disso, observa-se a formação de três grupos em cada figura com os seus respectivos correspondentes.

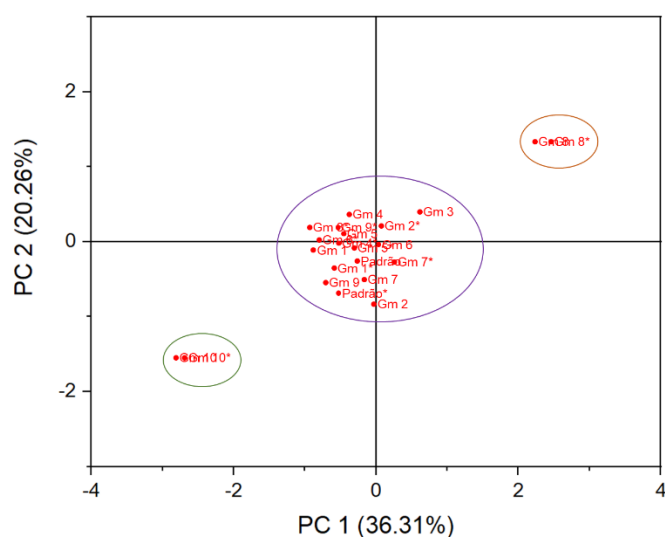


Figura 91: Gráfico de pesos PC1 x PC2 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.

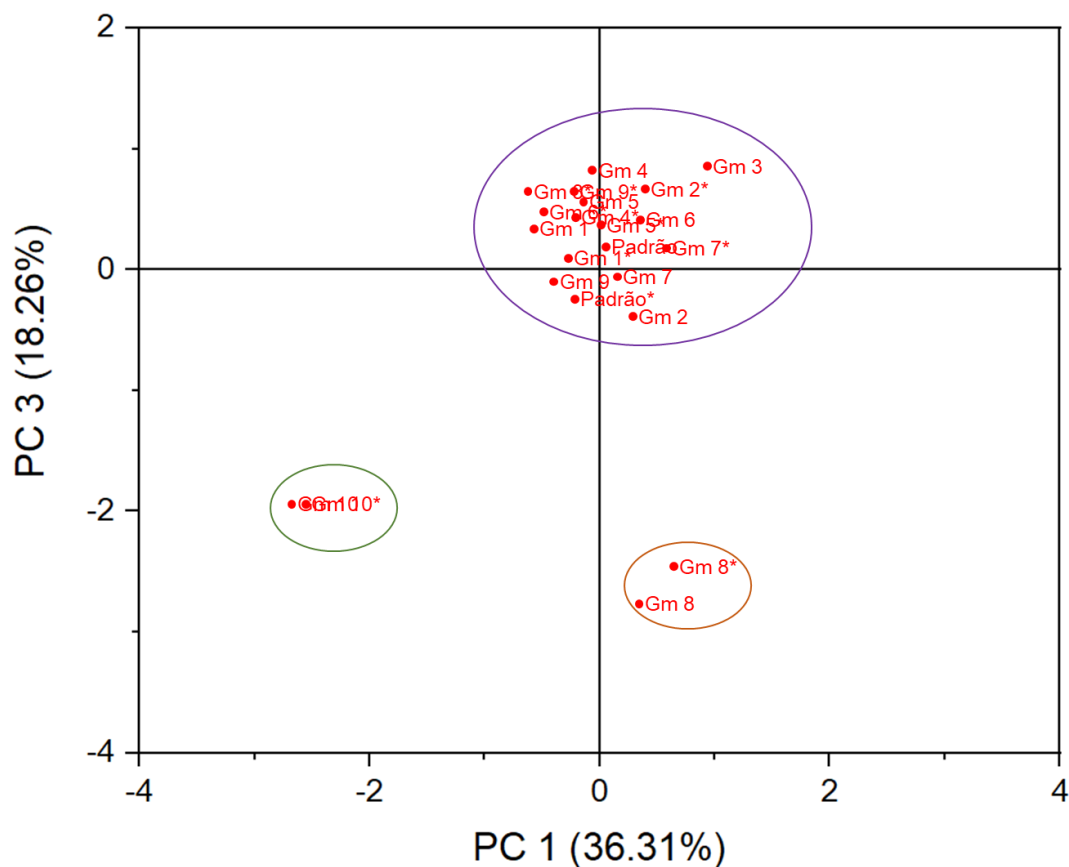


Figura 92: Gráfico de pesos PC1 x PC3 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.

Ambas Figuras 91 e 92, apresentam um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pelas amostras Gm 10* e Gm 10, um segundo grupo deslocado à direita abaixo composto pelas amostras Gm 8 e Gm 8*, um terceiro grupo formado pela amostra padrão e as demais. As siglas das amostras contendo asterisco (*), referem-se as análises realizadas por UV-Vis.



Fonte: <https://www.virtualmediclinic.com/library/cascara>

Cáscara Sagrada

7. *Rhamnus purshiana* – Cáscara Sagrada

7.1. Família Rhamnaceae

7.1.1 Aspectos Botânicos

A família Rhamnaceae L. Jussieu compreende aproximadamente 50 gêneros e 900 espécies, incluindo desde árvores e arbustos até trepadeiras lenhosas e ervas (RICHARDSON *et al.*, 2000; GIULIETTI *et al.*, 2005; JOLY, 1985; SCHULTZ., 1968; PORTER, 1959). As espécies pertencentes a esta família estão presentes em países com clima temperado e subtropical. No território brasileiro ocorrem em todas as regiões uma vez que é uma planta de fácil adaptação e cultivo (GIULIETTI *et al.*, 2005; JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959).

No Brasil, ocorrem naturalmente apenas 13 gêneros na flora nativa, os quais são *Alvimiantha*, *Ampelozizyphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus*, *Scutia*, *Zizyphus* (SOUZA e LORENZI, 2005; LIMA, 2010). O gênero *Rhamnus* está distribuído no Brasil entre as regiões Norte (Roraima), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (LIMA, 2010).

As espécies desta família apresentam folhas simples, pecioladas e de tamanho variável, alternadas, subopostas ou opostas, de bordo inteiro ou serrado, trinérveas ou peninérvias, glabras ou pilosas, com ou sem estípulas e, às vezes, providas de glândulas dispersas no limbo ou dispostas na extremidade de cada dente (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959). As flores, em geral, são actinomorfas, pentâmeras ou tetrâmeras, e simétricas; podem ser pediceladas ou sésseis, bissexuais ou unissexuais. O cálice é formado por sépalas coriáceas de perfloração valvar; a corola por pétalas pequenas, inguiculadas, côncavas ou cuculadas, que muitas vezes envolvem os estames opostos e de número igual ao seu. Ao redor do ovário médio ou ínfero, composto de carpelos sincarpis, existe um disco, ao qual estão presos os estames. As inflorescências são axilares, cimosas e, às vezes, compondo racemos; podem estar reduzidas a fascículos ou a uma única flor (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959). Os frutos são pequenos e drupáceos; podem ser capsular-esquizocárpico e alados nas espécies com ovário ínfero, raramente sâmaras. As sementes geralmente são diminutas, lisas e brilhantes, ao menos em frutos secos (SOUZA e LORENZI, 2005).

O gênero *Rhamnus* L. compreende espécies arbóreas ou arbustivas inermes, com folhas simples peninérveas, pedúnculos frutíferos não intumescidos e frutos drupáceos (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959).

7.1.1.1 Descrição da espécie *Rhamnus purshiana*.

A espécie *Rhamnus purshiana* (Figuras 91) é conhecida popularmente como rhamnus (ingles), sacred bark (inglês), cáscara sagrada (espanhol), cascara sagrada (francês), cascara sagrada (italiano); cascara e amerikanische faulbaum (alemão). Mantém sinonímia ao longo do mundo tais como: cáscara santa, casca persa, casca puchiana ou purshiana, espinha de cristo, madeira de oskso, espinha da Califórnia, casca amarga, casca de cáscara e cascararinde (VIANA, 2007).



Fonte: <https://landscapeplants.oregonstate.edu/plants/rhamnus-purshiana>

Figura 93: Exemplar de *Rhamnus purshiana*. (A) Arvoredo e (B) Detalhe das folhas e frutos.

A classificação taxonômica da espécie *Rhamnus purshiana* está representada no quadro 6.

Trata-se de uma árvore comum aos biomas Cerrado e Mata Atlântica. Sua área de dispersão abrange a Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959). No Brasil é uma planta nativa, não

endêmica, e ocorre nos estados da Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LIMA, 2010). Esta espécie apresenta um grande potencial farmacológico por ser enquadrada no gênero *Rhamnus*. Possui também um grande potencial para uso na recuperação de ecossistemas degradados (ZANON e MEDEIROS, 2002).

Quadro 6: Classificação taxonômica de *Rhamnus purshiana* L.

Classificação	
Reino	Plantae
Sub-reino	Viridiplantae
Filo	Streptophyta
Divisão	Tracheophyta
Subdivisão	Spermatophytina
Classe	Magnoliopsida
Superordem	Rosanae
Ordem	Rosales
Família	Rhamnaceae
Gênero	<i>Rhamnus</i>
Subgênero	<i>purshiana</i>
Espécie	<i>purshiana</i> L

Existem poucos relatos na literatura relacionados e direcionados para a espécie *Rhamnus purshiana* L. (Duarte *et al.*, 2008) realizaram a caracterização microscópica das folhas e caule desse vegetal. De acordo com esse estudo, a folha é hipoestomática, com estômatos do tipo anormocítico; possui tricomas tectores longos, pluricelulares e unisseriados predominantes na face abaxial; seu mesofilo é dorsiventral com uma camada subepidérmica parenquimática junto a superfície adaxial. Possui ainda drusas e células mucilaginosas, e a nervura central e o pecíolo são percorridos por um feixe vascular colateral. O caule apresenta epiderme; seu flogênio tem instalação periférica. Ocorrem ainda fibras gelatinosas, fibras lignificadas e um cilindro floemático externo ao xilemático. Foram evidenciados canais secretores, drusas e células com compostos fenólicos na nervura central e pecíolo da folha e no caule (DUARTE *et al.*, 2008).

7.1.2 Aspectos farmacológicos e químicos

Muitas espécies da família Rhamnaceae destacam-se por suas características digitalóides, diuréticas e hipotensivas e por suas propriedades terapêuticas, como no tratamento de doenças infecciosas, no combate à febre, no tratamento da asma, na atividade laxativa e como tônicos (CORRÊA, 1926).

Os estudos fitoquímicos com exemplares desta família têm demonstrado que a maioria das espécies apresenta em sua composição substâncias relacionadas à quinina, além de flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos (VIANA, 2007). Entre as espécies mais conhecidas e estudadas desta família destacam-se abaixo alguns gêneros e espécies, assim como suas atividades biológicas e principais componentes químicos.

A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* é utilizada no tratamento dos sintomas da malária e como antídoto contra veneno de cobras na região amazônica. Essa planta também apresentou atividade contra *Tripanossoma cruzi* em testes *in vitro*, além de possuir saponinas e triterpenos com ação sobre a diurese, comprovado em testes com animais (ratos) (KRETTLI *et al.*, 2001; ROSAS, 2007; DINIZ, 2009).

Colubrina retusa é outra espécie desta família e contém saponinas com pronunciada atividade antimicrobiana (LIN, 1999; ELSOHL, 1999). Existem ainda as plantas pertencentes ao gênero *Discaria*, que são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diabetes, afecções cutâneas e contra febre. A espécie *D. americana* possui atividade antibacteriana contra gramnegativos e gram-positivos, e apresenta em sua composição alcaloides ciclopeptídicos, triterpenóides, e óleo essencial, que contém alta atividade antioxidante (GIACOMELLI, 2004; RODRIGUEZ e MURRAY 2008).

Outro gênero da família Rhamnaceae que inclui espécies com propriedades farmacológicas é o *Gouania*, do qual se destacam as espécies *G. lupuloides* e *G. ulmifolia*, utilizadas popularmente no tratamento de leishmaniose e dores estomacais, respectivamente. *G. ulmifolia* também apresenta triterpenóides com atividade antimicrobiana (GIACOMELLI, 2007; GACHET, 2010).

Do gênero *Hovenia* destaca-se a espécie *H. dulcis*, uma planta comumente utilizada para fins nutricionais e medicinais no continente asiático, sendo originária da China e Japão. Os extratos deste vegetal têm demonstrado propriedades antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, hepatoprotetora, além da capacidade de detoxificação do etanol. Quanto à composição química, possui derivados saponinícos, saponinas triterpênicas e flavonóides (HYUN, 2010).

O gênero *Scutia* também apresenta relevância fitoquímica e farmacológica. A espécie *S. buxifolia* contém um teor elevado de flavonóides (quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina) nas folhas e cascas. Esses flavonóides encerram alto poder antioxidante. Além desses compostos, a espécie possui também alcalóides ciclopeptídicos, que demonstraram capacidade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (BOLIGON, 2009; MOREL, 2005). Antraquinonas isoladas de outra espécie deste gênero, a *S. myrtina*, apresentam propriedades anti-helmínticas e antiproliferativas sobre *Plasmodium falciparum* (AYERS, 2007; HOU, 2009).

Outro gênero relevante para esta família é o *Ziziphus*. As espécies deste gênero são reportadas por apresentarem diversas atividades biológicas e farmacológicas, entre as quais podemos citar atividade antinociceptiva, antiinflamatória, anti-helmíntica, antidiabética, ansiolítica, sedativa, entre outras. Quanto à composição química, já foram descritos alcalóides ciclopeptídicos, flavonóides, saponinas e triterpenos (PENG, 2000; LEE, 2003; ABDEL-ZAHER, 2005; BORGI, 2007; NISAR, 2007; PANDEY, 2008; BACHAYA, 2009).

Finalmente, o gênero *Rhamnus*, que inclui espécies de grande importância farmacológica e química, sendo as espécies *R. purshiana* e *R. frangula* as mais conhecidas no Brasil, principalmente por suas propriedades laxativas. Estas espécies são amplamente utilizadas pela população e sua composição química já está bem definida: apresentam compostos antraquinônicos, como antraquinonas livres (crisofanol, emodol), O-heterósidos (emodia-antrona), C-heterosídeos, taninos, sais minerais e princípios amargos (SYDISKIS, 1991; SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010). Existem ainda outras espécies com relevância química e farmacológica neste gênero. Dentre elas estão *R. nepalensis*, *R. alaternus*, *R. lycioides*, *R. nakarai*, *R. alpinus*, *R. formosana* e *R. cathartica*.

A espécie *R. nepalensis*, também conhecida como *R. nipalensis*, possui em sua composição esteróides e triterpenos, isoflavona (di-O-metildaidzeina), flavonóides e antraquinonas, entre as quais destaca-se a emodina. Este vegetal é utilizado pela medicina popular no tratamento de herpes e como hipotensivo, e possui ação citotóxica comprovada contra células provenientes de carcinoma humano (nasofaringe) (SINGH, 2001; MAI, 2001).

Rhamnus alaternus apresenta diversas atividades, como antibacteriana, antimutagênica, antígeno-tóxica, antioxidante, laxativa, purgativa, hipotensiva e capacidade de indução de apoptose em células cancerígenas. Quanto a sua composição

química, já foram descritos flavonóides e antraquinonas, dentre elas a emodina (LONGO, 2005; AMMAR, 2008, 2011; BHOURI, 2011).

A espécie *R. lycioides* é conhecida por sua forte propriedade hipotensora, sendo o principal mecanismo de ação desta atividade a inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Possui em sua constituição química flavonóides, esteróides e triterpenos, catequinas, taninos, açúcares, resinas e compostos antraquinônicos. A atividade anti-hipertensiva tem sido atribuída a procianidina glicosilada (TERENCIO, 1990; 1991).

Rhamnus nakaharai tem como propriedades a inibição de fosfodiesterases, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, inibição da agregação plaquetária, além do tratamento da constipação intestinal e asma (WEI, 2001; NG, 2007).

Rhamnus alpinus apresenta ação sobre o sistema gastrointestinal, além das propriedades antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante. Em sua constituição química estão presentes as antraquinonas aloemodina, réina, emodina, crisofanol e fisciona (GENOVESE, 2010).

A espécie *Rhamnus formosana* tem atividade anti-inflamatória e apresenta flavonóides e antraquinonas (LIN, 1991). Por fim, a espécie *R. cathartica*, que é conhecida por sua toxicidade, porém, também é usada como purgativa (LICHTENSTEIGER, 1997). Com base nos dados obtidos na literatura, conclui-se que entre os principais componentes químicos encontrados na família Rhamnaceae, considerando-se principalmente o gênero *Rhamnus*, estão os derivados antraquinônicos.

7.1.2.1 Compostos antraquinônicos

As antraquinonas pertencem à classe química das quinonas, que são produtos de oxidação de fenóis, e apresentam uma estrutura composta por dois grupamentos carbonílicos e duas ligações duplas entre carbonos. As quinonas são classificadas de acordo com o tipo de anel no qual estão inseridos os grupos carbonílicos e as duplas ligações (naftoquinonas, benzoquinonas e antraquinonas). A estrutura química básica das antraquinonas (Figura 94) é um anel antraceno com dois grupos cetonas nas posições C9 e C10 (SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010).

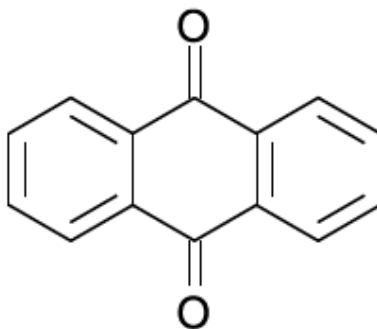


Figura 94: Estrutura química básica das antraquinonas.

As antraquinonas são as quinonas de maior relevância devido a sua importância farmacêutica. Entre as propriedades biológicas e farmacológicas descritas para antraquinonas estão toxicidade para cupins, ação protetora contra insetos, atividade alelopática, efeito laxante, atividade antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral, porém o uso como agente laxativo é o mais aplicado para esta classe de metabólitos (SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010).

Já foram descritas diversas antraquinonas para o gênero *Rhamnus*, (Figura 95), das quais destaca-se a emodina, de grande interesse farmacológico, devido à diversidade de atividades biológicas que tem apresentado. Este metabólito secundário tem sido encontrado em diversas espécies vegetais, principalmente das famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae, sendo esta última representada principalmente pelos gêneros *Rhamnus* e *Ventilago*.

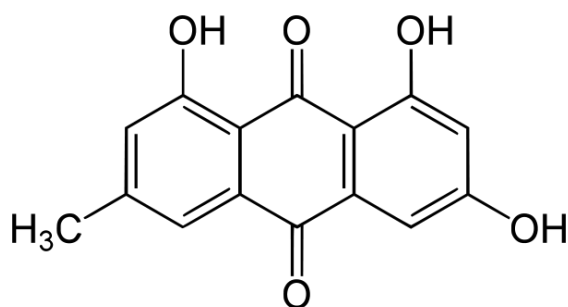


Figura 95: Estrutura química da Emodina.

No gênero *Rhamnus* existem 23 espécies nas quais este metabólito já foi identificado. A antraquinona emodina, tanto em sua forma livre (aglicona) como a glicosilada, tem sido isolada de várias partes das plantas (cascas, caule, folhas, flores, sementes e frutos) (IZHAKI, 2002). Apesar do amplo uso dos compostos antraquinônicos

como agentes laxativos, estudos recentes indicam que este uso, quando em grandes quantidades e/ou em longo prazo, pode estar associado ao aumento do risco no desenvolvimento de tumores colo-retal; entretanto, o uso em curtos períodos é considerado seguro. Outro fator relevante na utilização medicinal de antraquinonas são as interações medicamentosas, pois, devido a sua ação laxativa, podem diminuir a absorção de outros fármacos, e conseqüentemente, diminuir a eficácia do outro tratamento (VAN GORKON, 1999).

Devido aos compostos antracênicos, a *Rhamnus purshiana* se comporta como colágo (operando sobre a vesícula biliar), hipocolesterolemizante, laxante (quando usada em doses baixas) e purgante (em doses maiores) (CUNHA, 2008; MAHAN *et al.*, 2010; CAPASSO *et al.*, 2000; IZZO *et al.*, 1997).

Suas propriedades são valorizadas em casos extremos pela sua eficiência na limpeza e desintoxicação do cólon. Alguns profissionais da área de saúde já a usam em programas de limpeza antes da cirurgia ou para exames referentes ao intestino (CARVALHO e SILVEIRA, 2010; BRUNETON, 2001; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; BRANDÃO, 1997; CARVALHO e ALMANÇA, 2003).

Entre os componentes de *R. purshiana* podem ser encontrados compostos antracênicos na forma de O- e C-glicosídeos (MAHADY, 2004; MALEŠ *et al.*, 2010), além de ácidos graxos de cadeia longa compostos 24 fenólicos diversos (BARNES *et al.*, 2012). As cascas contêm cerca de 6 a 9 % de derivados antracênicos, dos quais 80-90% são C-glicosídeos de antronas. Os constituintes majoritários são cascarosídeos A(1), B(2), C(3), D(4), E(5), F(6) (Figura 96) (MANITTO *et al.*, 1993, 1995; DERWICH, 2001) que contêm tanto C- quanto O-glicosídeos.

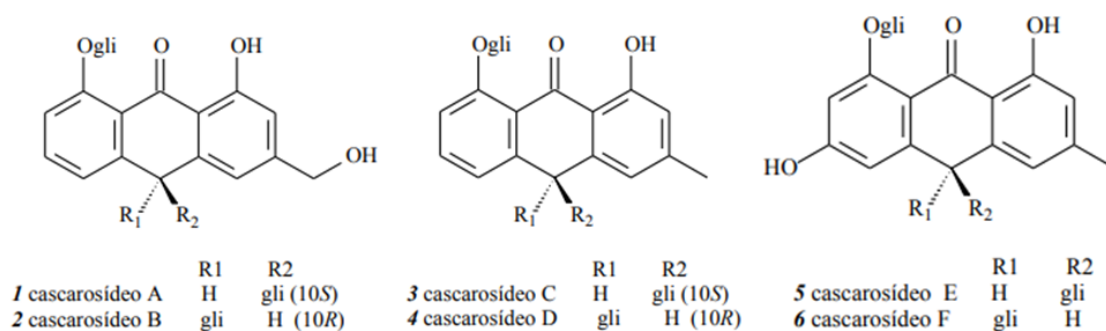
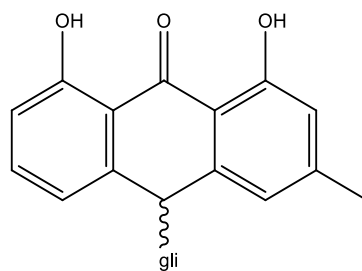


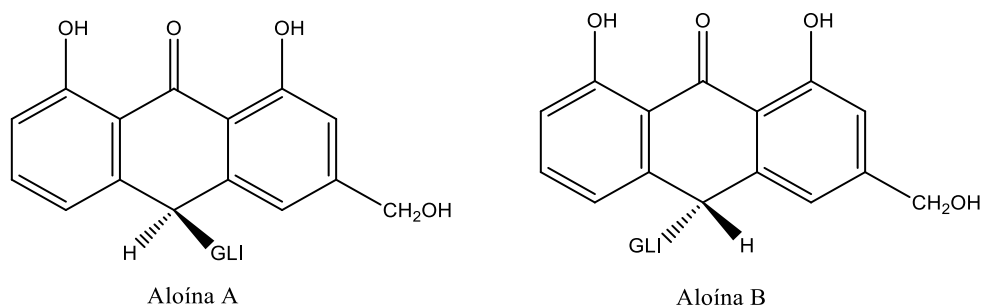
Figura 96: Representação estrutural dos constituintes antraquinônicos de *R. purshiana*. Cascarosídeo A(1), Cascarosídeo B(2), Cascarosídeo C(3), Cascarosídeo D(4), Cascarosídeo E(5), Cascarosídeo F(6).

Além dos compostos cascarosídeos, outros glicosídeos hidroxiantracênicos como crisaloína (Figura 97), aloínas A e B (Figura 98) (MANITO *et al.*, 1990); rheinosídeos A-D (Figura 99a-d) (MANITO *et al.*, 1990); glicosídeos de fisciona (Figura 100a), crisofanol (Figura 100b) e aloe-emodina (Figura 100c) (van der BERG *et al.*, 1987), bem como frangulina (Figura 100d) (PARIS, 1963), perfazem cerca de 30% da casca.



Crisaloína (desoxibarbaloina)

Figura 97: Representação da estrutura química da Crisaloína.



Aloína A

Aloína B

Figura 98: Representação das estruturas químicas da Aloína A e Aloína B.

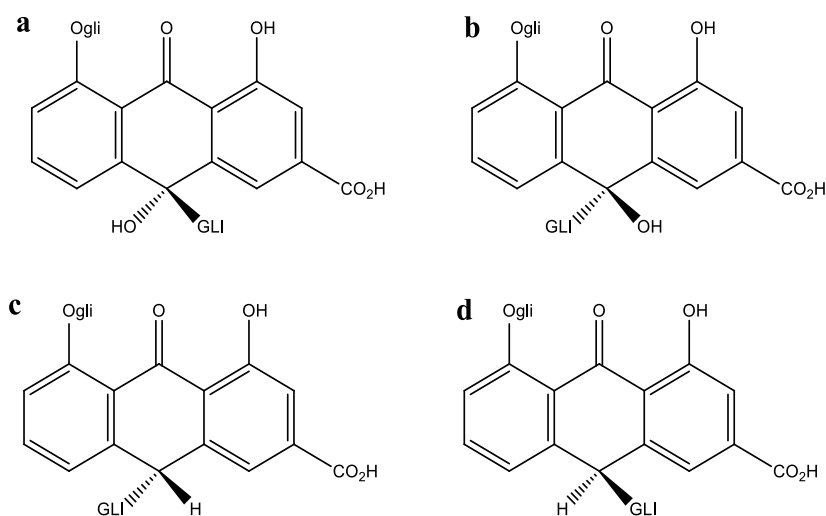


Figura 99: Representação das estruturas químicas dos rheinosídeos. (a) rheinosídeo A; (b) rheinosídeo B; (c) rheinosídeo C e (d) rheinosídeo D.

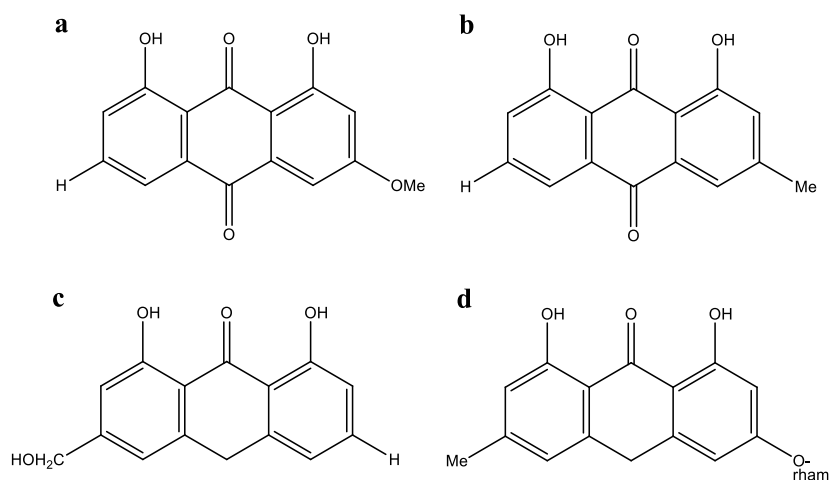


Figura 100: Representação das estruturas químicas dos compostos fisciona (a), crisofanol (b), aloe-emodina (c) frangulina(d).

Podem ser encontrados ainda glicosídeos de fiscionantrona (Figura 101A1) crisofanolantrona (Figura 101A2) e emodinantrona (Figura 101A3) (VAN DEN BERG e LABADIE, 1984). Crisofanol-8-O-glicosídeo e aloe-emodina 8-O-glicosídeo estão entre os compostos mais abundantes (10-20%) (MAHADY, 2004). Diantronas também estão presentes, tais como palmidinas A-C (Figura 101B-D) (YARNELL, 2007; KINGET, 1967), emodina-diantrona (Figura 101E), aloceomodina-diantrona Figura 101B-F) (KINGET, 1967), além de purshianina (Figura 101G).

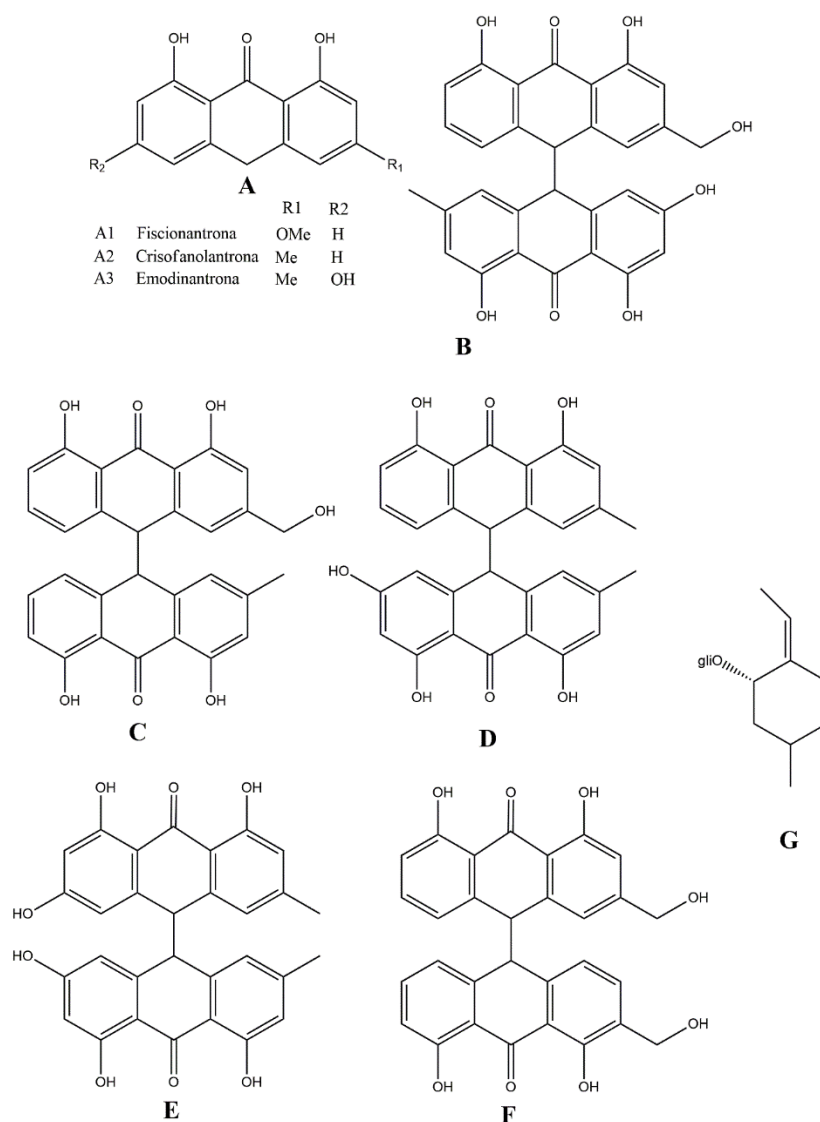


Figura 101: Representação dos principais metabólitos secundários encontrados em *R. purshiana*. Gli = Glicose.

Quanto aos ácidos graxos, as cascas contêm ácidos palmítico (Figura 102a) e esteárico (Figura 102b) (DOHME e ENGELHARDT, 1898).

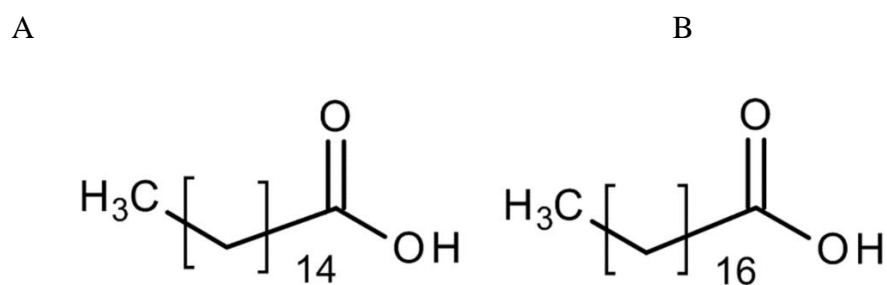


Figura 102: Representação dos ácidos graxos presentes em *R. purshiana*.

É de fundamental importância o conhecimento sobre quais fatores podem influenciar a composição química da espécie vegetal. A produção e, conseqüentemente, a proporção dos metabólitos secundários podem variar com alterações sazonais e circadianas, além de dependerem também da idade e do desenvolvimento da planta (CZELUSNIA *et al.*, 2012). Por exemplo, o conteúdo de C-glicosídeos, O-glicosídeos e antraquinonas livres nos brotos e folhas de *R. purshiana* variam marcadamente durante o ano (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Em muitas espécies de uso medicinal, também tem sido constatada certa plasticidade fisiológica e anatômica, em função das condições ambientais de cultivo (CONTIN, 2009). Há uma relação importante entre intensidade da luz e produção de metabólitos secundários. Por exemplo, em um experimento utilizando células de *R. purshiana* cultivadas em fotoperíodo de 12 horas, a produção de derivados antracênicos foi aumentada. Foi observado que a produção de emodina foi significativamente aumentada enquanto a produção de fisiona não foi afetada. Em contrapartida, a produção de derivados antracênicos foi afetada negativamente quando a cultura de células foi mantida sob luminosidade constante (VAN DER BERG *et al.*, 1988). A biossíntese de derivados antracênicos ocorre via a rota acetato-malonato, por meio de condensações aldólicas, ciclizações e enolizações.

7.2 Resultados e Discussão

Buscou-se desenvolver um método analítico por CLAE que demonstrasse o perfil cromatográfico da *Rhamnus purshiana*, além de quantificar os marcadores selecionados, Cascarosídeo A, Cascarosídeo B, emodina e aloe-emodia, bem como demonstrar se o método é indicativo de estabilidade da amostra em análise, visando o seu emprego no estudo de estabilidade dos derivados vegetais e fitoterápicos.

Foram realizados vários testes (cerca de 90 sistemas gradientes foram testados) usando colunas diferentes, composição e pH das fases móveis, além de alterações no fluxo e temperatura da análise, entretanto o método que resultou em melhor separação dos compostos e estabilização do sistema cromatográfico foi o gradiente apresentado na Figura 8.

7.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.

7.2.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório

O primeiro passo para análise em HPLC é separar, com boa resolução, todos os compostos de interesse presente em uma solução padrão. Este estudo consiste em pesquisar qual a melhor fase móvel e sua composição, para obtenção de picos resolvidos.

Estabelecido as condições de separação para os composto padrões presentes em *R. purshiana*, não foi difícil otimizar as condições, para obter os valores de k aceitáveis. Para isso foi utilizado uma programação de gradiente de eluição. O cromatograma da Figura 103, apresenta a separação de todos os compostos em tempo de análise menor que 80 min. A Tabela 54 apresenta os parâmetros de separação obtidos.

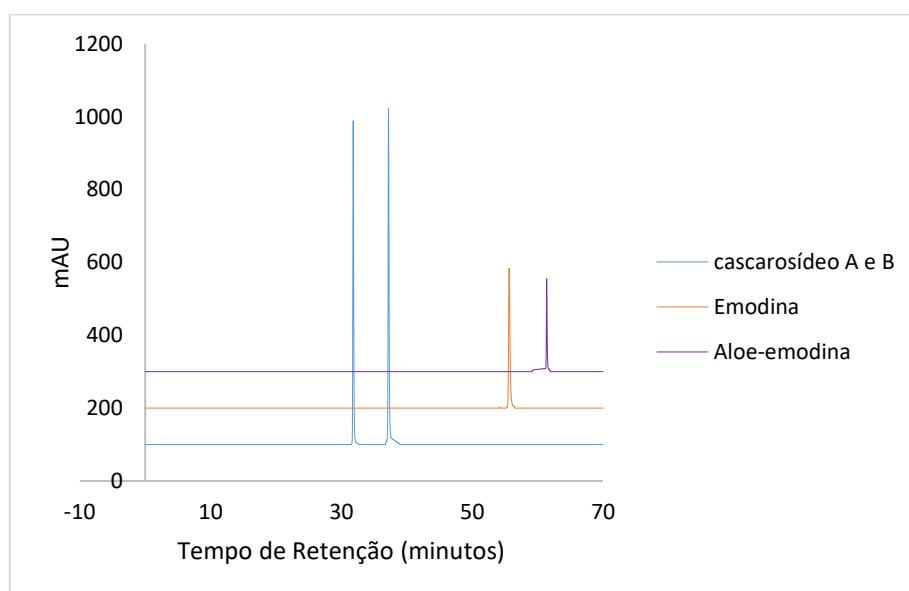


Figura 103: Cromatograma dos padrões utilizados como marcadores para *R. purshiana*, Casanthrol (azul), Emodina (laranja) e Aloe-emodina (lilás).

A Tabela 54 resume os tempos de retenção, fator de retenção e fator de separação ou seletividade para cada amostra padrão em *R. purshiana*.

Tabela 54: Combinação de eluição das amostras padrões de *R. purshiana*: Casanthrol, emodina e aloe-emodina.

Amostra	t_R	k	α	R_s	N
Cascarosídeo A	31,12	62,24	-	-	1549527,04
Cascarosídeo B	39,02	78,04	1,3	2,8	243609664,00
Emodina	56,45	112,9	1,4	4,02	5098564,00
Aloe-emodina	61,35	122,7	1,1	2,7	2676496,00

* t_R = tempo de retenção (minutos); k = fator de retenção e α = fator de separação ou seletividade, R_s = Resolução, N = Numero de pratos teóricos.

A partir da Tabela 54, observa-se que obteve-se excelente separação dos compostos, uma vez que o fator de separação ou seletividade, α , apresentou valor maior do que 1, da mesma forma que a resolução, R_s , obtida está de acordo com os valores exigidos pela literatura, maior ou igual a 1,5 (SNYDER *et al.*, 1997). Isto significa que, nestas condições os compostos analisados estão resolvidos, ou seja, otimamente separados. Na presença de interferentes, analisando amostras reais, estes fatores devem continuar constantes. Outros fatores como pH e força iônica da fase móvel não foram estudados, pois o método proposto apresentou-se eficiente. Verificou-se também, que fatores como estes são menos utilizados para separação destes compostos, segundo a bibliografia (BARCELÓ *et al.*, 1992; VITALI *et al.*, 1994; JIMÉNEZ *et al.*, 1997). A Figura 104 apresenta os padrões para análise de *R. purshiana* sumarizados em uma única análise.

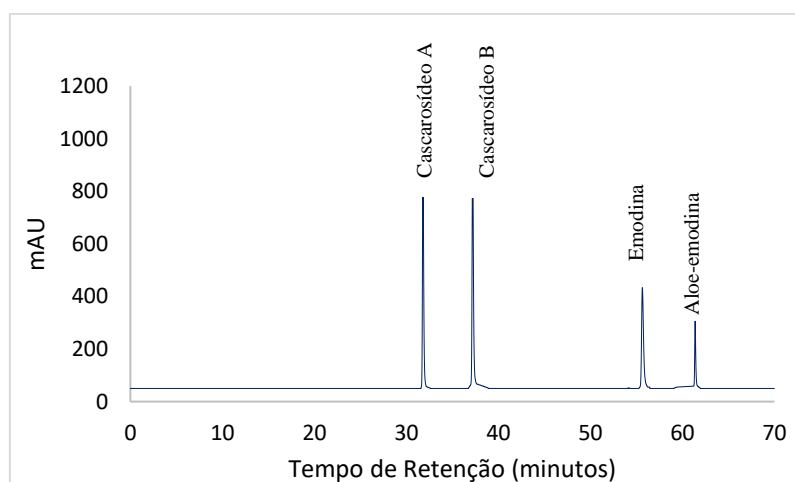


Figura 104: Espectro dos padrões combinados de *R. purshiana*: Casanthrol (cascarosídeo A e B), emodina e aloe-emodina, respectivamente.

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. O valor de resolução calculado foi acima de 2,0, o que mostra a total separação entre os picos. A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos quatro marcadores.

7.2.1.2 Espectro de UV para os marcadores

A varredura espectral de 200 a 800 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e assim uma melhor resposta de sinal cromatográfico. Considerando o espectro UV dos padrões obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos (Figura 105a-c), o cromatograma dos padrões foi obtido em 265 nm (Figura 106).

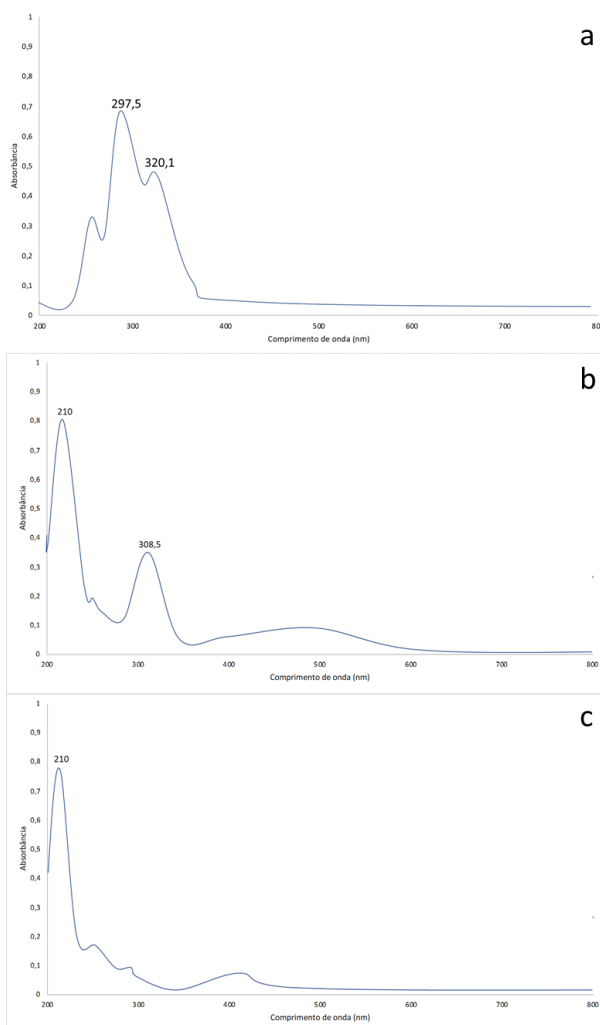


Figura 105: Espectro de UV dos compostos Casanthrol (a), Emodina (b), Aloe-emodina (c).

A identificação preliminar dos marcadores nas amostras estudadas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV, e confirmadas através da co-injeção de soluções dos padrões.

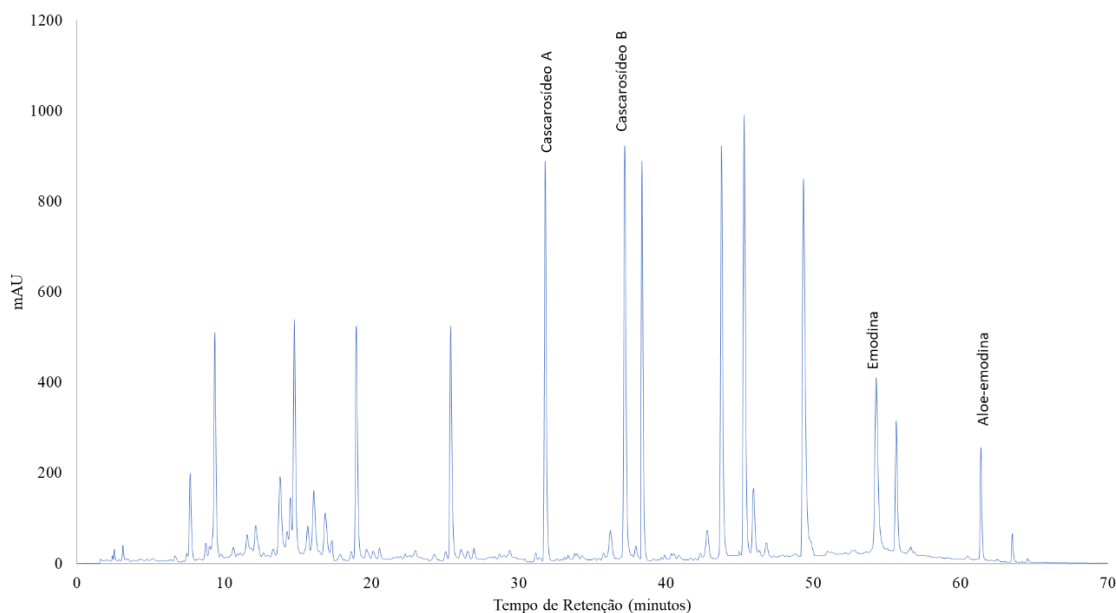


Figura 106: Cromatograma de *R. purshiana* obtido em 265 nm.

7.2.2 Validação do método analítico desenvolvido

7.2.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O teste de seletividade foi realizado comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira obtida com as soluções de trabalho mistas na faixa de concentração de 0,1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=8$ pontos, incluindo o ponto zero) e a segunda curva analítica obtida a partir de 500 μL destas soluções diluídas com 500 μL das amostras. Neste caso, quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz e, portanto, o método é seletivo.

Na Figura 107 estão apresentados os resultados obtidos no estudo de seletividade do método para amostra de *R. purshiana*.

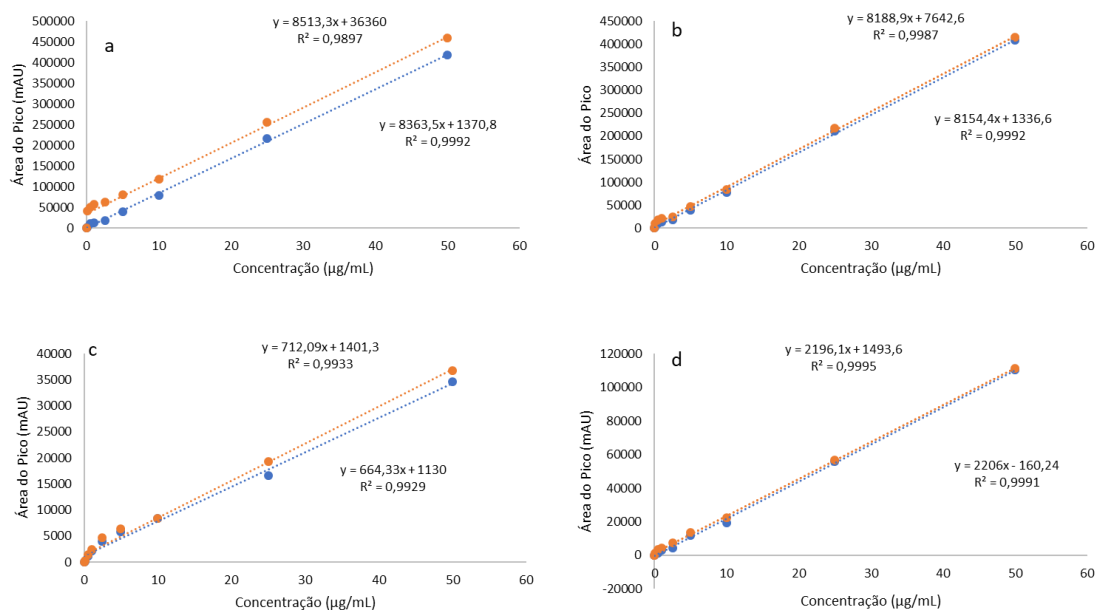


Figura 107: Curva analítica das amostras de *R. purshiana* adicionadas de padrão (laranja) e dos padrões puros (azul). Em (a) cascarosídeo A, (b) cascarosídeo B, (c) emodina e (d) aloe-emodina,

As razões (r_a) entre os coeficientes angulares das curvas para cascarosídeo A e B, emodina e aloe-emodina, respectivamente, foram $r_a = 1,01; 0,99; 1,04$. A partir dos valores obtidos de r_a , nenhum efeito de matriz foi observado quando a amostra de *R. purshiana* foi analisada.

As curvas analíticas do método com os respectivos coeficientes de determinação, utilizando-se o detector de DAD, na faixa de concentração de $0,1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 8$) estão representadas na Tabela 55.

Tabela 55: Curvas analíticas ($y=mx+b$) para determinação dos padrões por CLAE-DAD para amostras de *Rhamnus purshiana*.

Amostra	Curva analítica	R^2
Cascarosídeo A	$y = 8513,3x + 36360$	0,9897
Cascarosídeo B	$y = 8188,9x + 7642,6$	0,9987
Emodina	$y = 712,09x + 1401,3$	0,9933
Aloe-emodina	$y = 2196,1x + 1493,6$	0,9995

O estudo da faixa linear de trabalho para cada componente utilizado como padrão foi feito como complemento ao teste de linearidade, visando a definição do intervalo de concentração no qual fosse possível quantificar de forma segura os analitos. Para isto, foram construídos os gráficos mostrados na Figura 108. Considerou-se como faixa linear de trabalho, os intervalos nos quais os pontos estavam inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico. Para cada padrão foram avaliados 10 níveis de concentração.

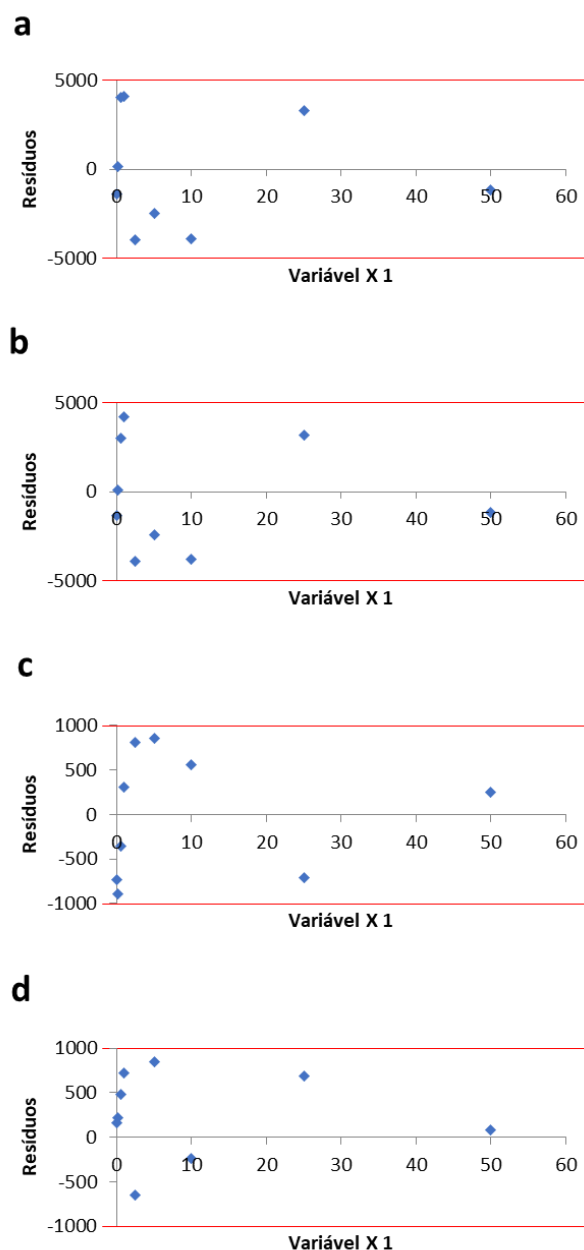


Figura 108: Gráfico de resíduos mostrando a faixa linear de trabalho. As linhas vermelhas correspondem ao intervalo de confiança de 95%. Cascarosídeo A (a), Cascarosídeo B (b), Emodina (c) e Aloe-emodina (d).

A análise dos gráficos de resíduos gerados a partir de ajustes de modelos lineares aos dados de calibração revela que os resíduos gerados são pequenos e não apresentam heterocedasticidade e, também, nenhuma tendência que demonstre a falta de ajuste dos modelos, confirmando sua adequação às respostas obtidas.

7.2.2.2 Adição dos marcadores

Para corroborar a identidade dos marcadores químicos em matrizes complexas como extratos bruto de plantas, a adição de quantidades conhecidas desses marcadores é de suma importância. Em tal metodologia, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis em uma matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância (ANDRADE, 1987). Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz (SNYDER *et al.*, 1997).

A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. A Figura 109 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *R. purshiana* com o cromatograma adicionado dos padrões e na Figura 110 a análise dos marcadores comparando ao cromatograma de *R. purshiana*.

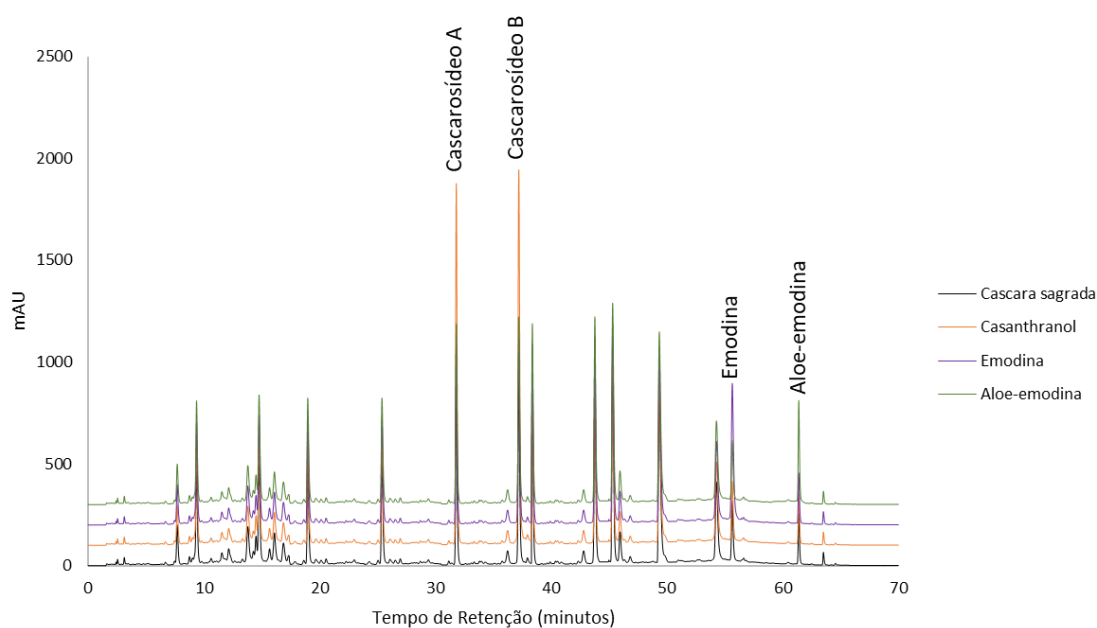


Figura 109: Cromatograma de *R. purshiana* concomitantemente com adição de padrões como marcadores químicos: Amostra padrão – identificada (preto), casanthranol (laranja), Emodina (roxo) e Aloe-emodina (verde).

A Figura 110 apresenta o espectro da amostra identificada de *R. purshiana* e o cromatograma da análise dos padrões numa única corrida.

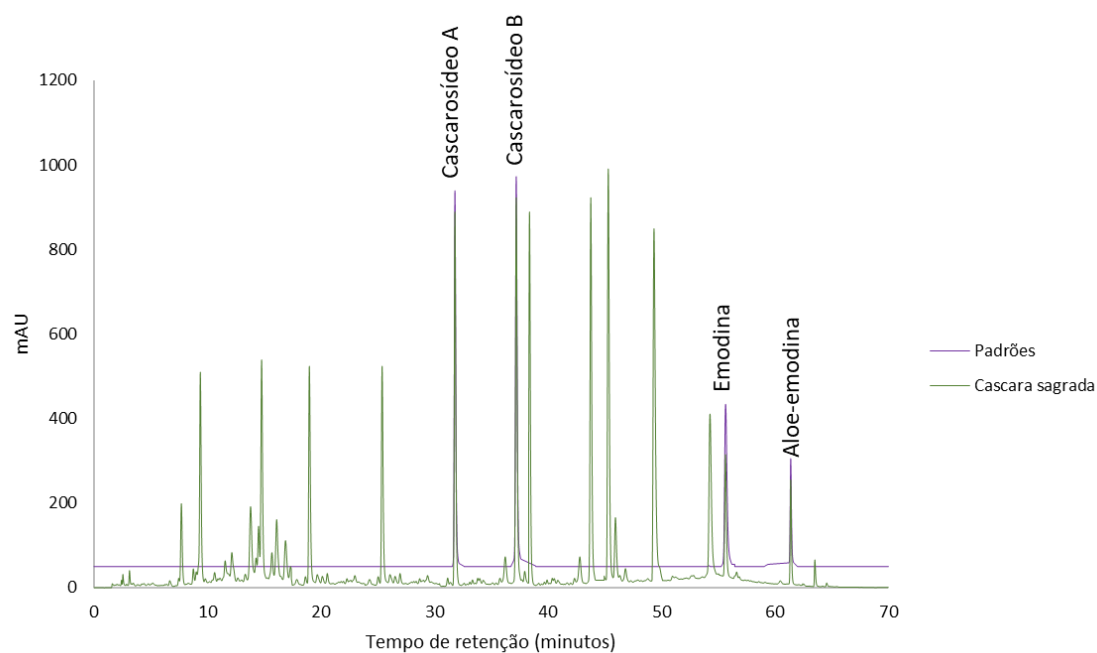


Figura 110: Figura mostrando o cromatograma de *R. purshiana*, identificado, (verde) e o cromatograma dos padrões (laranja).

Tal método é, entretanto, especialmente importante quando a amostra é complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando há dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (MOREAU, 2008).

A partir da análise das Figuras 109 e 110, pode-se notar que a adição dos padrões ocasionou um incremento nos picos das substâncias analisadas de *R. purshiana*. Tal fato é fundamental para a confirmação de identidade.

7.2.2.3 Robustez

De acordo com o Inmetro (2003), a robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Considera-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

A robustez do método foi avaliada a partir da verificação da concentração determinada em relação ao padrão (100 µg/mL) e alterando-se o fluxo da fase móvel (Quadro 7).

Os resultados obtidos no quadro abaixo cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas. De fato, o desvio padrão relativo (DPR) foi baixo. Dessa forma, os dados estão dentro de um índice de confiabilidade de 95%.

Quadro 7: Avaliação da robustez através da modificação no fluxo da fase móvel para os padrões de *R. purshiana*.

Marcador	Condições Alteradas	Concentração (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	DP	DPR (%)
Cascarosídeo A	Método original	100,07	99,99	0,08	0,08
		99,98			
		99,91			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,06	100,11	0,22	0,22
		99,92			
		100,35			
	Fluxo (0,8mL/min)	100,01	100,18	0,16	0,16
		100,32			
		100,22			
Cascarosídeo B	Método original	100,05	100,02	0,03	0,03
		100,01			
		99,99			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,05	100,04	0,02	0,02
		100,02			
		100,04			
	Fluxo (0,8mL/min)	100,24	100,21	0,11	0,11
		100,31			
		100,09			
Emodina	Método original	100,09	100,03	0,06	0,06
		100,02			
		99,97			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,02	100,01	0,06	0,06
		100,06			
		99,95			
	Fluxo (0,8mL/min)	100,15	100,15	0,01	0,01
		100,16			
		100,14			
Aloe-emodina	Método original	100,12	100,16	0,04	0,04
		100,15			
		100,2			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,18	100,15	0,06	0,06
		100,08			
		100,19			
	Fluxo (0,8mL/min)	100,32	100,36	0,04	0,04
		100,39			
		100,37			

DP = Desvio Padrão, DPR = Desvio Padrão Relativo

7.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Com o software *Chromeleon* foi possível medir o ruído (μ_{Abs}) e o sinal (μ_{Abs}) proporcionado pelo detector ao passar um analito. O ruído foi obtido através de uma amostra em branco, enquanto o sinal através de uma solução padrão contendo todos os compostos numa concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas amostras foram injetadas em triplicada no sistema cromatográfico, nas condições estabelecidas, obtendo uma média dos ruídos e dos sinais, relativo a concentração dos analitos. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados da seguinte forma:

$$LD = C \times \frac{3}{S_m/R_m} \qquad LQ = C \times \frac{10}{S_m/R_m}$$

Onde:

C = concentração do composto ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

S_m = média dos sinais obtidos (μ_{Abs}) ($n = 3$)

R_m = média do ruído (μ_{Abs}) ($n = 3$)

3 = a razão S/R mínima para um pico ser detectado com segurança

10 = a razão S/R mínima para um pico ser quantificado com segurança (SNYDER, 1997)

A Tabela 56 apresenta os valores estimados de LD e LQ da técnica para os compostos analisados nas condições de separação e quantificação estabelecidas. Os valores de LD e LQ estão de acordo com a sensibilidade de cada composto como pôde ser observado através das curvas analíticas.

Tabela 56: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *R. pusrshiana*.

Padrão	S_m/R_m	LD	LQ
Cascarosídeo A	14,35	0,011	0,035
Cascarosídeo B	105,70	0,009	0,032
Emodina	174,9	0,008	0,029
Aloe-emodina	64,42	0,016	0,035

Os LD variaram entre 0,008 e $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de LD mais baixos foram obtidos para o Emodina ($0,008 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de LD mais altos foram obtidos para

Cascarosídeo A e Aloe-emodina, com valores iguais a 0,011 e 0,016 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Vale ressaltar, que os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

7.2.2.5 Precisão

A precisão (repetibilidade ou reprodutibilidade) mede o grau de incerteza de um método analítico surgido devido à dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos (BACCAN *et al.*, 2001). A repetibilidade indica a concordância dos resultados obtidos pelo mesmo método sob as mesmas condições (operador, equipamento, laboratório etc.) em um curto período. Da mesma forma, a reprodutibilidade indica a concordância de resultados individuais obtidos em diferentes condições (WELZ e SPERLING, 1999).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo admitidos valores superiores a 15% (BRASIL, 2002; ICH, 2005). O desvio padrão relativo é calculado pela razão entre desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) e a média dessas medidas (X_c), geralmente em porcentagem, conforme equação a seguir:

$$RSD\% = \left(\frac{S_c}{X_c} \right) \cdot 100$$

A precisão pode sofrer variações caso as réplicas sejam realizadas em diferentes laboratórios ou no mesmo laboratório, porém em diferentes períodos (WELZ e SPELING, 1999).

7.2.2.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução padrão ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), executada por um mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período, conforme apresentado na Tabela 57.

Tabela 57: Dados de repetibilidade para os marcadores de *R. purshiana* na concentração de 1,00 µg mL⁻¹.

Repetição	Cascarosídeo A	Cascarosídeo B	Emodina	Aloe-emodina
1	1,010	1,102	0,985	1,032
2	1,021	1,098	0,996	1,038
3	1,008	1,087	0,992	1,029
4	0,998	1,115	0,995	1,036
5	0,996	1,080	0,999	1,025
6	1,007	1,089	0,990	1,029
Média	1,0067	1,095	0,993	1,031
DP	0,009	0,012	0,005	0,005
DPR (%)	0,90	1,14	0,52	0,48

Constatou-se neste trabalho, em todos os testes realizados, que o método apresentou baixos percentuais de DPR, isto é, inferior a 15% (ANVISA, 2003; ICH, 1995), indicando uma boa repetitividade.

A metodologia proposta apresenta considerável precisão. Logo, o método proposto apresenta precisão suficiente para as substâncias antraquinônicas, capaz de proporcionar resultados próximos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003; ICH, 1995).

É importante mencionar que produtos intermediários (extratos vegetais) são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como nos bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto a composição das matrizes biológicas. Desta forma, o DPR deve ser menor ou igual a 15% para aceitar uma curva de calibração, enquanto que para os métodos analíticos se aceita no máximo 5%.

Portanto, quanto mais próximos entre si estiverem os valores experimentais (menor amplitude), mais preciso será o método. Esta medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados dos ensaios (ANVISA, 2003).

7.2.2.5.2 Precisão intermediária

A precisão verificada para os padrões de *R. purshiana* no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas Tabelas 58 e 59, respectivamente.

Tabela 58: Precisão intra-dia do método para quantificação dos marcadores de *R. purshiana* por HPLC, na concentração de 1,00 µg mL⁻¹.

Repetição	Cascarosídeo A	Cascarosídeo B	Emodina	Aloe-emodina
1	1,010	1,102	0,985	1,032
2	1,021	1,098	0,996	1,038
3	1,008	1,087	0,992	1,029
4	0,998	1,115	0,995	1,036
5	0,996	1,080	0,999	1,025
6	1,007	1,089	0,990	1,029
Média	1,0067	1,095	0,993	1,031
DP	0,009	0,0125	0,005	0,005
DPR (%)	0,90	1,14	0,52	0,48

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

Tabela 59: Precisão inter-dia do método para quantificação dos marcadores de *R. purshiana* por HPLC, na concentração de 1 µg mL⁻¹

N	Cascarosídeo A		Cascarosídeo B		Emodina		Aloe-emodina	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	1,0100	1,0560	1,1020	1,0330	0,9845	1,0088	1,0322	1,0211
2	1,0210	1,0595	1,0980	1,0403	0,9956	1,0179	1,0382	1,0296
3	1,0080	1,0475	1,0870	1,0278	0,9915	1,0096	1,0288	1,0184
4	0,9980	1,0565	1,1150	1,0273	0,9948	1,0110	1,0359	1,0170
5	0,9960	1,0380	1,0800	1,0170	0,9993	1,0082	1,0251	1,0106
Média	1,0066	1,0515	1,0964	1,0291	0,9931	1,0111	1,0320	1,0193
DP	0,0101	0,0088	0,0136	0,0085	0,0056	0,0040	0,0053	0,0069
DPR (%)	1,00	0,83	1,24	0,83	0,56	0,39	0,51	0,68

Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey (p = 0,05).

N = número de análises realizadas; Valores expressos em concentração (µg mL⁻¹).

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

Na análise de matrizes complexas, como extrato de plantas, é sabido que a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2 e 20 % (ROZET *et al.*, 2007). Por outro lado, para a validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a decisão deva apresentar desvio padrão relativo (DPR) menor que 20 % (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007). Dessa forma, todos os resultados obtidos estão dentro do limite sugerido.

5.2.2.6 Exatidão

Geralmente, os métodos de análise envolvem a transferência do analito de matrizes complexas para soluções mais simples, possibilitando, assim, a determinação instrumental. No entanto, este procedimento resulta, na maioria das vezes, em perda do analito ou em retenção de porções deste na própria matriz depois da extração, levando a uma quantificação errônea (THOMPSON *et al.*, 1999).

Diante do exposto, a recuperação do método deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a substância de interesse, o que pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), a recuperação depende da matriz da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Além disso, os autores enfatizam que as recuperações devem estar na faixa de 70-120% de recuperação para um método poder ser validado. Portanto, todos os valores obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, assim, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

Na Tabela 60, constam os dados obtidos por CLAE para os testes de recuperação da amostra, expressos em termos de porcentagem de recuperação.

Tabela 60: Recuperação das soluções padrão dos marcadores de *R. purshiana* adicionadas às amostras e analisadas pelo método proposto (n=3)

Composto	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Adicionada	Encontrada	% Recuperação
Cascarosídeo A	0,05	0,048	96,00
	1,00	1,050	105,00
	5,00	4,850	97,00
Cascarosídeo B	0,05	0,047	94,00
	1,00	0,980	98,00
	5,00	5,030	100,60
Emodina	0,05	0,049	98,00
	1,00	1,090	109,00
	5,00	5,140	102,80
Aloe-emodina	0,05	0,057	114,00
	1,00	1,170	117,00
	5,00	5,230	104,60
	5,00	4,870	97,40
		Média	102,56

7.2.3 Espectrofotometria UV-VIS

Ao se observar os perfis espectrais (Figura 111) das 3 amostras de *R. purshiana* analisadas com adição do marcador químico, percebeu-se que os espectros obtidos na região compreendida entre os comprimentos de onda de 200 a 500 nm trazem informações relevantes acerca das análises, sobre os marcadores, uma vez que esta é a faixa de absorção de tais amostras.

A análise dos espectros não apresentou problemas de variação sistemática da linha-de-base nem variações aleatórias associadas a ruídos nos dados. Sendo assim, não houve necessidade da realização de nenhum pré-processamento (correção de linha base, suavização, etc.) aplicado às amostras analisadas.

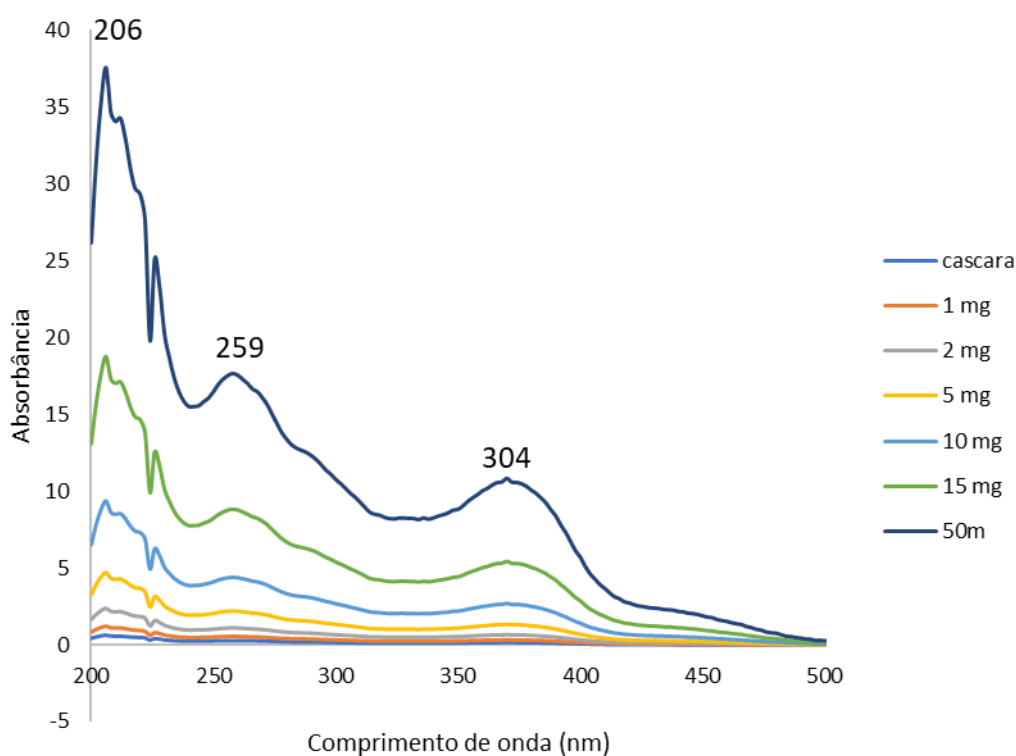


Figura 111: Espectros ultravioleta das amostras de *R. purshiana* com adição de padrão interno na região de 200 a 500 nm.

Com a adição de soluções de concentrações conhecidas dos marcadores utilizados ocorre um incremento de absorbância característico de cada marcador químico. A adição de marcador interno é de suma importância quando se trabalha com matrizes complexas. Dessa forma, a Figura 113 apresenta as curvas analíticas obtidas por UV-Vis e a Tabela

61 apresenta os coeficientes da curva analítica ($y = mx + b$), bem como o coeficiente de correlação, r^2 .

As curvas analíticas, mostradas na Figura 112, foram utilizadas para quantificação dos compostos presentes tanto nas amostras de *R. purshiana* comercializados no estado da Bahia tanto quanto amostras de fitoterápicos.

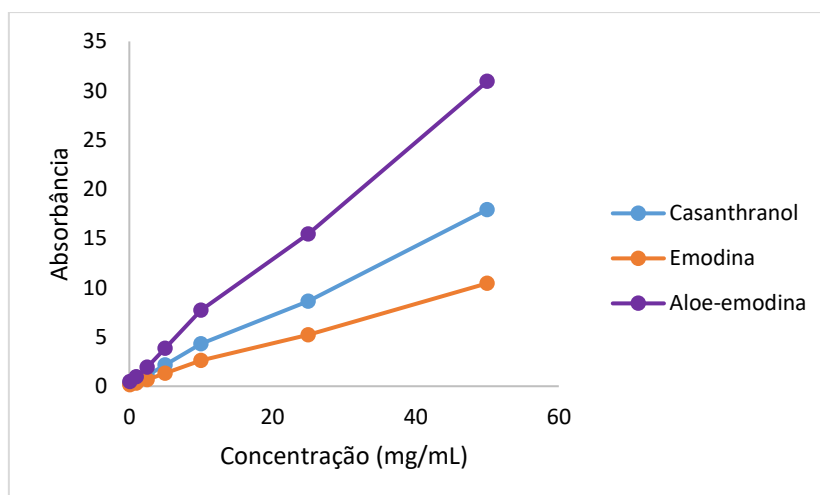


Figura 112: Curvas analíticas dos padrões de *R. purshiana* obtidos por UV-vis com padronização interna.

Tabela 61: Valores obtidos de "m", " b " e "r" através da regressão linear da curva analítica.

Composto	m	b	R ²
Casanthranol	0,3502	0,3014	0,998
Emodina	0,2046	0,2258	0,998
Aloe-emodina	0,6059	0,6687	0,999

Estes resultados indicam que a linearidade está dentro do intervalo de concentração testada para os padrões. A correlação dos dados observados na Tabela 61, apresentou um coeficiente de correlação superior a 0,998 para todas as substâncias padrões estudadas.

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório. A Tabela 62 sumariza os resultados das análises.

Tabela 62: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *R. purshiana* coletadas no estado da Bahia. Rp (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso e nas amostras de fitoterápicos

Amostra	Concentração dos padrões (mg/g) \pm desvio padrão					
	Casanthranol		Emodina		Aloe-emodina	
Padrão	160,125	\pm 0,065	5,025	\pm 0,042	2,514	\pm 0,030
Rp 1	162,458	\pm 0,019	4,935	\pm 0,017	2,489	\pm 0,037
Rp 2	158,365	\pm 0,015	4,789	\pm 0,057	2,456	\pm 0,065
Rp 3	159,035	\pm 0,099	4,998	\pm 0,073	2,531	\pm 0,068
Rp 4	242,984	\pm 0,046	5,089	\pm 0,063	2,515	\pm 0,245
Rp 5	164,359	\pm 0,079	5,159	\pm 0,427	2,516	\pm 0,529
Rp 6	157,102	\pm 0,774	5,201	\pm 0,631	2,359	\pm 0,575
Rp 7	156,285	\pm 0,488	5,035	\pm 0,519	2,156	\pm 0,397
Rp 8	145,359	\pm 0,549	5,015	\pm 0,276	2,541	\pm 0,170
Rp 9	174,259	\pm 0,003	5,316	\pm 0,063	2,468	\pm 0,101
Rp 10	200,459	\pm 0,123	5,149	\pm 0,139	2,494	\pm 0,198
ARp	160,253	\pm 0,154	4,875	\pm 0,258	2,451	\pm 0,258
BRp	29,331	\pm 0,361	4,951	\pm 0,258	2,465	\pm 0,171
CRp	71,575	\pm 0,154	4,568	\pm 0,084	2,365	\pm 0,052
DRp	95,885	\pm 0,014	4,215	\pm 0,020	5,125	\pm 0,056
ERp	50,201	\pm 0,025	4,885	\pm 0,092	3,125	\pm 0,052

Rp = *Rhamnus purshiana*

7.2.4 Aplicação da metodologia proposta.

Para aplicação da metodologia proposta, a Figura 113 apresenta os resultados obtidos para as análises de *R. purshiana* comercializados em feiras livres do estado da Bahia. A análise da figura permite observar que há diferenças na concentração dos metabólitos entre as amostras estudadas (Tabela 63), bem como diferenças nos espectros.

O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000). O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade (EWANS, 1994; CALIXTO, 2000).

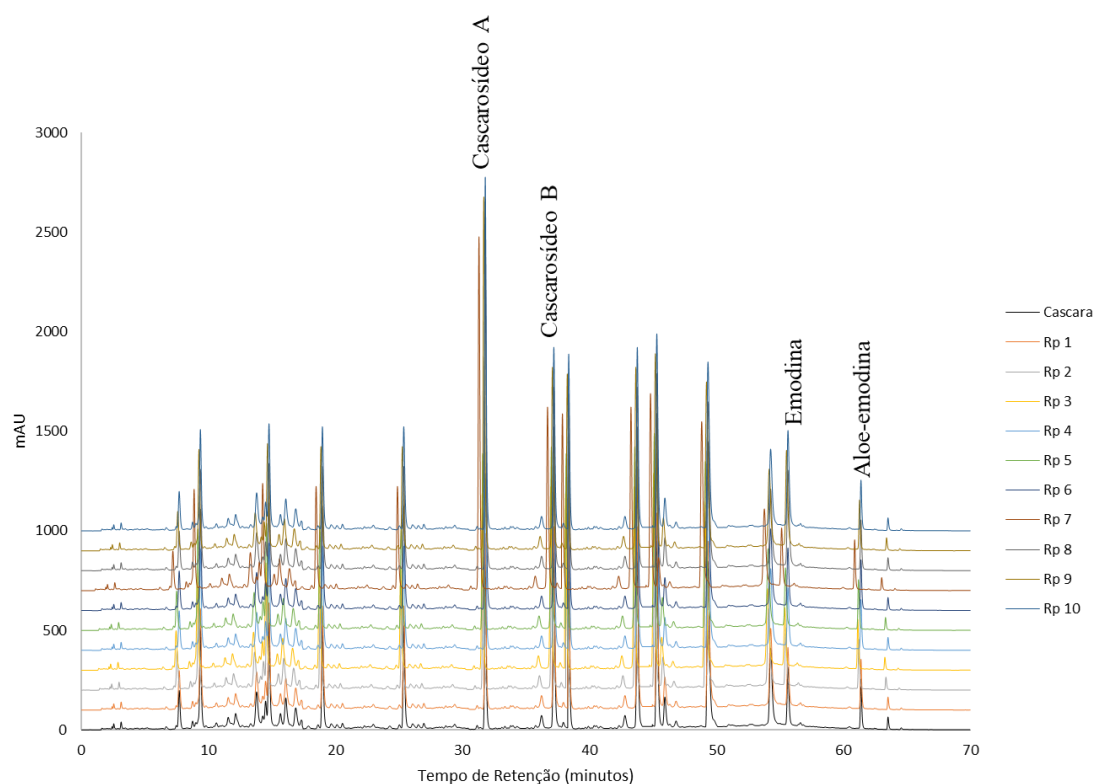


Figura 113: Cromatograma das amostras de *R. purshiana* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

Analisando a Figura 113, observa-se que as todas as amostras apresentam os picos característicos da espécime vegetal. Todavia, as amostras *Rp 4*, *Rp 6*, *Rp 8* e *Rp 9* apresentaram intensificação dos picos, quando comparados ao padrão, de cascariosídeo A, emodina e aloe-emodina, respectivamente (Tabela 63).

Uma possível justificativa para essas diferenças é que a cáscara sagrada não deve ser utilizada antes de decorrido um ano de sua coleta salvo se for submetida a processo de oxidação acelerada, em estufa a 100-105 °C, durante 1 hora (BRASIL, 2010). Pode ter ocorrido alguma falha no processo de oxidação acelerada ou até mesmo a utilização antes do período estabelecido em literatura.

As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas antes de 28 dias, prazo recomendado (STANDARD METHODS, 1997).

A Tabela 63 sumariza o resultados das análises

Tabela 63: Concentração de cascarosídeo A, cascarosídeo B, emodina e aloe-emodina em amostras de *R. purshiana* comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

Amostra	Concentração dos padrões (mg/g) \pm desvio padrão							
	Cascarosídeo A		Cascarosídeo B		Emodina		Aloe-emodina	
Padrão	96,0750	\pm 0,042	72,0563	\pm 0,051	5,1531	\pm 0,065	2,3763	\pm 0,082
Rp 1	97,4748	\pm 0,017	73,1061	\pm 0,046	5,0608	\pm 0,064	2,3526	\pm 0,063
Rp 2	95,0190	\pm 0,057	71,2643	\pm 0,093	4,9111	\pm 0,126	2,3214	\pm 0,140
Rp 3	95,4210	\pm 0,073	71,5658	\pm 0,104	5,1254	\pm 0,138	2,3923	\pm 0,161
Rp 4	145,7904	\pm 0,063	109,3428	\pm 0,276	5,2187	\pm 0,398	2,3772	\pm 0,362
Rp 5	98,6154	\pm 0,427	73,9616	\pm 0,742	5,2905	\pm 1,006	2,3781	\pm 1,104
Rp 6	135,2612	\pm 0,631	70,6959	\pm 0,890	5,3336	\pm 1,178	2,2298	\pm 1,384
Rp 7	93,7710	\pm 0,519	70,3283	\pm 0,657	5,1633	\pm 0,855	2,0379	\pm 1,047
Rp 8	87,2154	\pm 0,276	65,4116	\pm 0,308	6,1428	\pm 0,392	2,4018	\pm 0,507
Rp 9	104,5554	\pm 0,063	78,4166	\pm 0,132	5,4515	\pm 0,183	4,3328	\pm 0,190
Rp 10	120,2754	\pm 0,139	90,2066	\pm 0,267	5,2802	\pm 0,366	2,3574	\pm 0,390

Os extratos secos de *R. purshiana* utilizados como matéria-prima para a fabricação de amostras comerciais são padronizados em cascarosídeo A. Todavia, não há regulamentação específica para a padronização mínima dos princípios ativos (ANVISA, 2014). Por outro lado, segundo a legislação brasileira, a dose diária deve estar entre 20 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em cascarosídeo A (ANVISA, 2014), corroborada por Barnes e colaboradores (2012) e outros autores (MAHADY, 2004; GARRATT *et al.*, 1973).

A Tabela 64 apresenta a análise de cinco amostras comerciais de *R. purshiana* comercializadas em Salvador – Bahia, Brasil. E a Tabela 65 apresenta a variação em percentagem das análises comparadas ao declarado pelo fornecedor.

Tabela 64: Concentração dos marcadores em amostras comerciais de *R. purshiana* comercializadas em Salvador – Bahia, Brasil.

Amostra	Concentração dos padrões (mg/g) \pm desvio padrão							
	Cascarosídeo A		Cascarosídeo B		Emodina		Aloe-emodina	
ARp	96,1518	\pm 0,258	72,1139	\pm 0,386	4,9993	\pm 0,515	2,3167	\pm 0,592
BRp	16,3474	\pm 0,258	10,8982	\pm 0,300	5,0772	\pm 0,385	2,3299	\pm 0,488
CRp	42,7450	\pm 0,084	29,5588	\pm 0,094	4,6844	\pm 0,120	2,2354	\pm 0,155
DRp	69,9315	\pm 0,020	27,4483	\pm 0,066	4,3224	\pm 0,093	4,8442	\pm 0,088
ERp	33,1206	\pm 0,092	19,8405	\pm 0,098	5,0095	\pm 0,124	2,9538	\pm 0,164

Tabela 65: Comparação percentual dos teores* de cascarosídeos utilizados em amostras comerciais de *R. purshiana*.

Amostra	Valor declarado (%)	Valor encontrado (%)	Variação (%)
A_{RP}	16	105,16	5,16
B_{RP}	12	136,23	36,23
C_{RP}	-	29,70	-
D_{RP}	-	37,13	-
E_{RP}	-	39,48	-

*Os teores referem-se a padronização por cascarosídeo A

A análise da Tabela 64 e 65 mostra que há variações em relação a quantidade de cascarosídeo nas amostras analisadas. As diferenças encontradas para os produtos comerciais variaram entre 5,16% (produto A_{RP}) e 36,23% (produto C_{RP}), em relação aos metabólitos presentes. Dessa forma, verifica-se que há necessidade de controle de qualidade rigoroso nas amostras comerciais. Com relação as amostras C_{RP}, D_{RP} e E_{RP}, não se pode determinar a correlação, uma vez que a bula desses medicamentos não continha tal informação.

7.2.5 Análises estatísticas

A química, a partir das experiências que promove, procura extrair informação explicável em termos de teoria que possibilite estabelecer novas teorias, que depois de devidamente validadas pretende, transformar dados em informação e informação em conhecimento (CORDELLA, 2012). Para conseguir esse propósito recorre às ferramentas numéricas disponíveis, dividindo-se estas em dois grupos: um grupo que analisa as variáveis e a informação inerente de forma isolada, estatística univariada, e outro, a análise multivariada que pretende tratar e compreender dados complexos analisando e interpretando o conjunto das variáveis produzidas no seu todo, em simultâneo, com o objetivo de produzir informação (VALLE, 2012).

A análise multivariada é uma análise exploratória de dados que desempenha um papel crucial no que diz respeito á redução e simplificação de dados sem grande perda de informação. No caso de ser admissível proceder a uma aproximação em espaços bi- ou tridimensionais, é possível uma visualização gráfica aproximada do conjunto de dados

(MARTIN, 2004; VILELLA *et al.*, 2015). O modelo estatístico dos métodos multivariados revela-se, assim, um instrumento poderoso quando se pretende analisar informação proveniente de inúmeras amostras caracterizadas por diversas variáveis (VALLE, 2012). O agrupamento de objetos necessita de uma medida de semelhança, fazendo com que os objetos similares sejam agrupados ou colocados em grupos separados. O PCA é um método exploratório não paramétrico capaz de extrair informação relevante a partir de um conjunto de dados (MARTIN, 2004).

7.2.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A análise de similaridade (HCA) é um modelo confiável para avaliar a impressão digital cromatográfica (*fingerprint*) de várias fontes com base no cálculo dos coeficientes correlativos dos dados originais. Os coeficientes de correlação de similaridade entre os perfis cromatográficos foram calculados pelo uso do software profissional de análise de cromatograma.

Os resultados do HCA são mostrados na Figura 114.

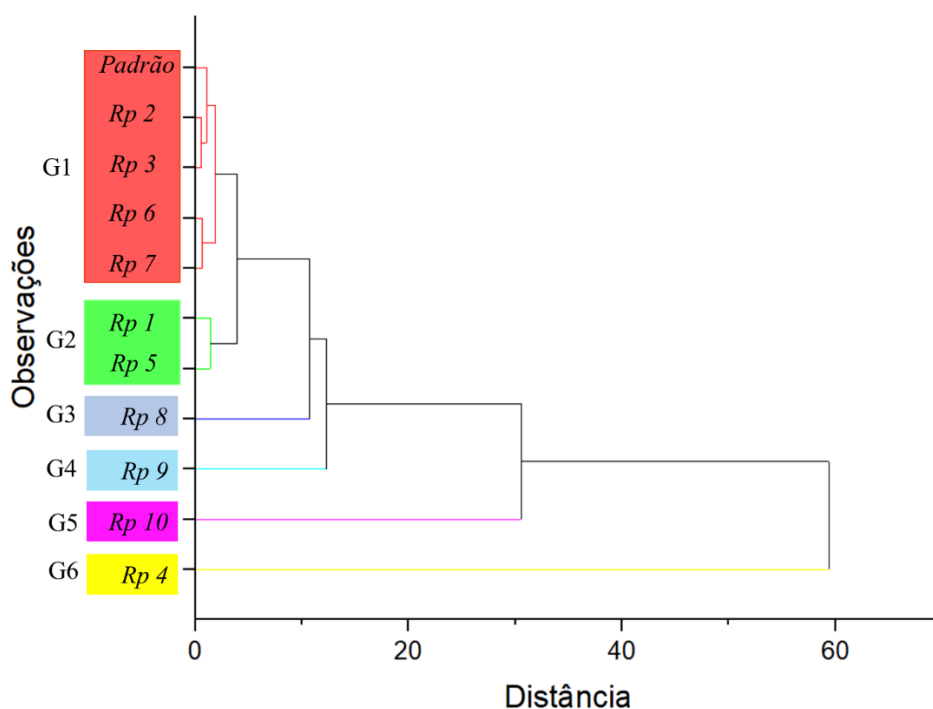


Figura 114: Dendrograma de Quatro composições químicas para 11 amostras de *R. purshiana*. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5, grupo 5 e G6: grupo 6.

No dendrograma HCA, a menor distância entre duas amostras indicou sua maior similaridade e as amostras agrupadas no mesmo grupo foram as mais similares. O grupo 1 composto pelas amostras: padrão, Rp 2, Rp 3, Rp 6 e Rp 7 S6 e S10, com maior similaridade foram classificados em um aglomerado, da mesma forma que o grupo G2, composto por Rp 1 e Rp 5. As outras amostras, Rp 8 Rp 9, Rp 10 e Rp4, formaram grupos a parte: grupo 3, grupo 4, grupo 5 e grupo 6, respectivamente. Dessa forma, podemos inferir que os resultados de agrupamento poderiam ser causados pelas diferenças de origem vegetal, efeito do ambiente, estação de coleta, condições de armazenamento, etc. das amostras.

7.2.5.2 Análise de plotagem de radar

Um gráfico de radar (Figura 115) foi usado para avaliar a qualidade das amostras de *R. purshiana* por causa de sua discriminação simples, rápida e rotineira. Para facilitar a comparação, o gráfico de radar foi empregado para classificar preliminarmente as amostras de *R. purshiana*. com base no conteúdo dos quatro componentes em 11 amostras comercializadas no estado da Bahia.

A Figura 115a mostra as médias dos quatro componentes em G1-G6 no HCA. Como mostrado, as distribuições dos quatro componentes das amostras *R. purshiana*. de vários grupos exibiram padrões característicos diferentes. As amostras do G3 apresentaram um conteúdo distintamente menor dos componentes e foram facilmente discriminadas em comparação com as amostras outros grupos.

Como mostrado na Figura 115b, a distribuição dos padrões de composição química apresentou características semelhantes. Este achado indicou que as amostras apresentam características semelhantes. No entanto, a medição visual foi o único resultado recebido pela análise de plotagem de radar, e a falta de indicadores claros descrevendo as distinções exatas reduziu a confiabilidade dos resultados. Portanto, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada nos estudos a seguir.

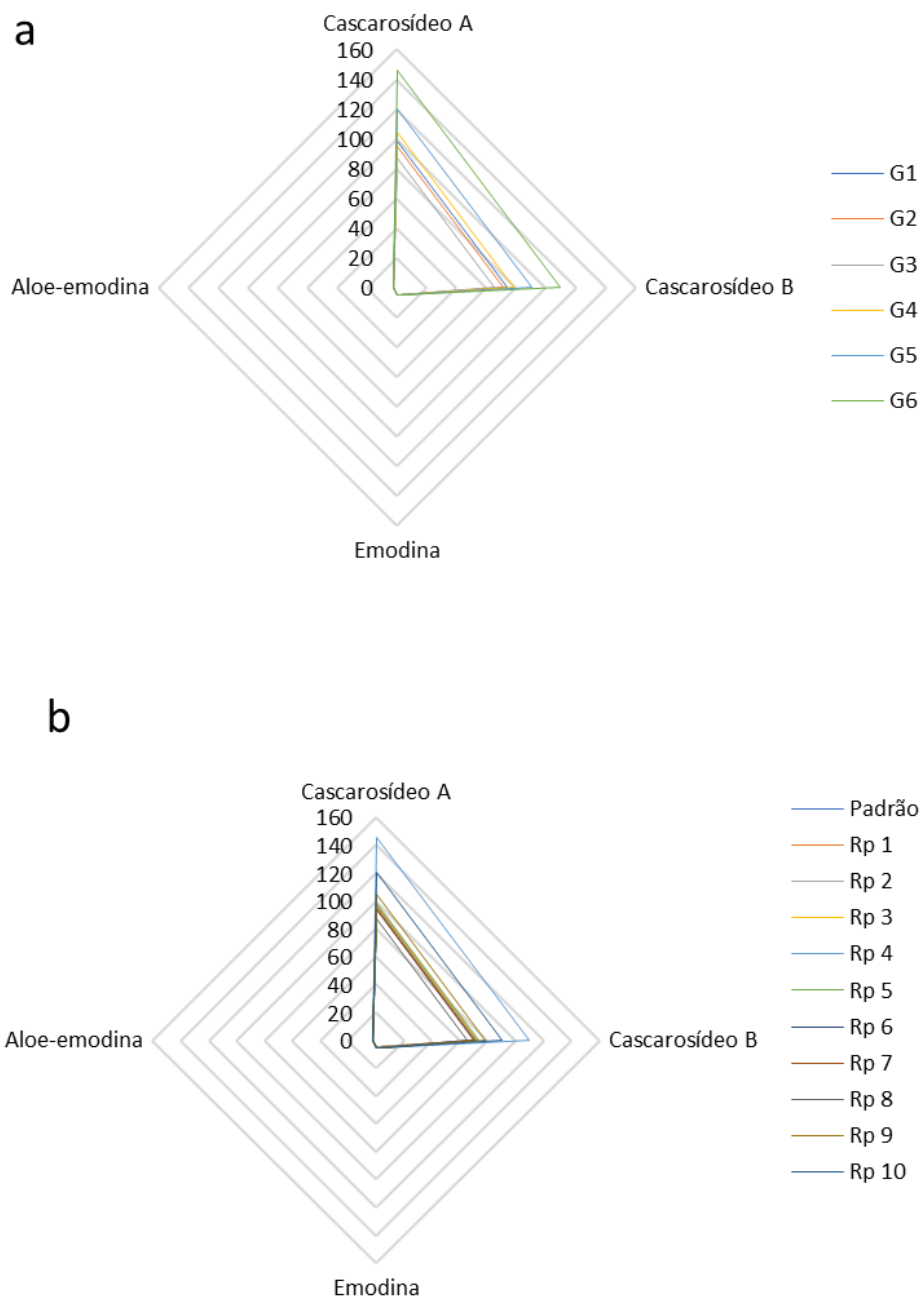


Figura 115: Gráficos de radar mostrando a diferença de origens geográficas em termos de quatro componentes em várias amostras de *R. purshiana*; (a) G1, G2, G3, G4, G5 e G6. (b) A distribuição da composição química de 11 amostras.

7.2.5.3 Análise dos componentes principais (PCA)

Para avaliar o teor dos elementos em estudo, a distribuição dos mesmos nas matrizes analisadas, dentre outros aspectos, realizou-se a análise de componentes principais utilizando o programa Origin.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 66, observa-se que as duas primeiras componentes principais formadas (PC1 54,63 %; PC2 26,07 %) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas três componentes juntas permitem explicar 80,70 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão. A Figura 116 mostra o gráfico de cotovelo.

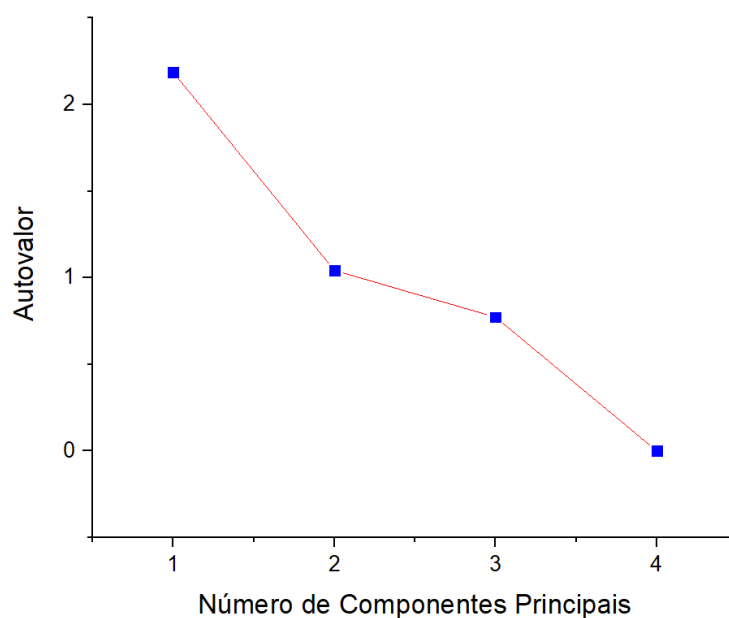


Figura 116: Gráfico de autovalor *versus* numero de componentes principais

Tabela 66: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	2,1853	54.63%	54.63%
2	1,04255	26.06%	80.70%
3	0,77215	19.30%	100.00%
4	0	0.00%	100.00%

A Tabela 67 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número

de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 67: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2
Cascarosídeo A	0,65911	0,00743
Cascarosídeo B	0,65911	0,00743
Emodina	0,27702	-0,66453
Aloe-emodina	0,23326	0,74719

Os maiores pesos são observados para as variáveis Carcarosídeos A e B, na primeira componente principal, responsáveis por explicar a maior variância dos resultados nesse fator. Já a variável Aloe-emodina apresenta maior peso em PC 2. É sabido que a grandeza dos pesos é avaliada assumindo seus valores numéricos em módulo

7.2.6.5.1 Análise de PC1 x PC2

Obteve-se os gráficos de pesos (Figura 117) e escores (Figura 118) para a análise de PC1 x PC2. A partir da análise da Figura 117, observa-se que a PC2 é responsável pela separação dos compostos, uma vez que emodina e aloe-emodina apresentam maiores contribuições com valor negativo e positivos, respectivamente.

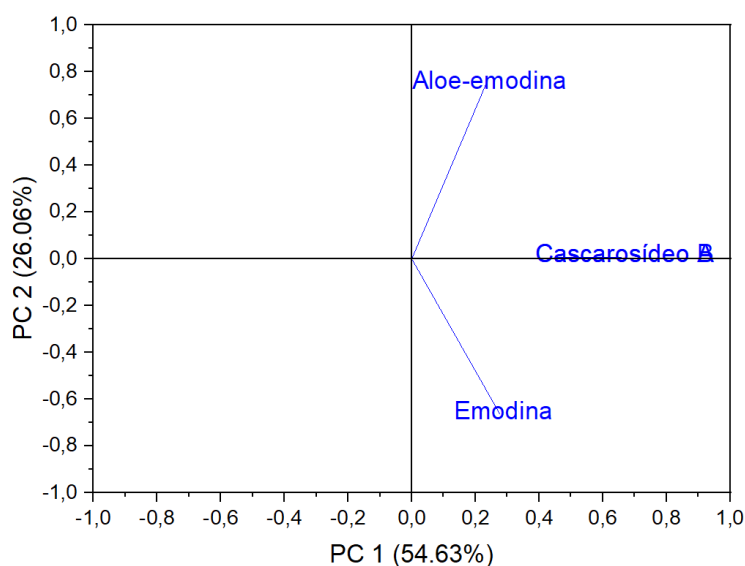


Figura 117: Gráfico de pesos PC1 x PC2.

Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, nota-se a formação de seis grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda acima, composto pelas amostras padrão, Rp 1, Rp 2, Rp 3 e Rp 8, um segundo grupo central pela amostra Rp5, um terceiro grupo à esquerda abaixo formado pelas amostras Rp 6 e Rp 7 e outros tres grupos constituídos pelas amostras Rp 9, Rp 10 e Rp 4, respectivamente.

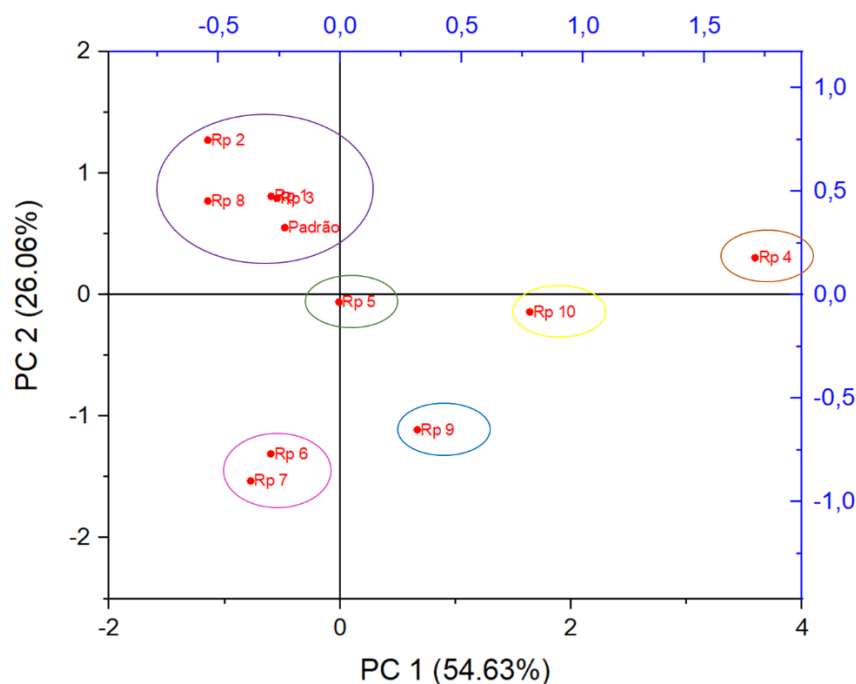


Figura 118: Gráfico de escores PC1 x PC2.

Os resultados obtidos nas Figuras 117 e 118 permitem avaliar a condição e a qualidade das drogas vegetais analisadas. De fato, as amostras , Rp 1, Rp 2, Rp 3, Rp 5 e Rp 8 são mais semelhantes em quantidade de metabólitos com a amostra padrão do que as outras amostras. Essa correlação indica que a quantidade de metabólitos e, conseqüentemente, principio ativo, cascarosídeo, afetam diretamente a produção de medicamentos. Tal fator é de suma importância para averiguar a terapêutica e evitar possíveis reações adversas, como hepatotoxicidade.

7.2.5.3.2 Análise de PCA tridimensional

Além da análise clássica da PCA, é possível a plotagem de gráfico usando tres componentes principais e assim possibilitar uma visão tridimensional da dispersão dos pontos, conforme Figura 119. O *software* utilizado permite a plotagem tridimensional e

também possibilita a rotação do conjunto de dados do gráfico, sendo possível visualizar a distribuição dos pontos sob diversos ângulos, tornando possível observar a melhor posição onde os pontos de uma amostra de *R. purshiana* encontram-se separados dos pontos de outra amostra. Dessa forma, aumentam as possibilidades de encontrar pontos no espaço que nos permitem verificar a correlação ou a discrepância entre as amostras analisadas.

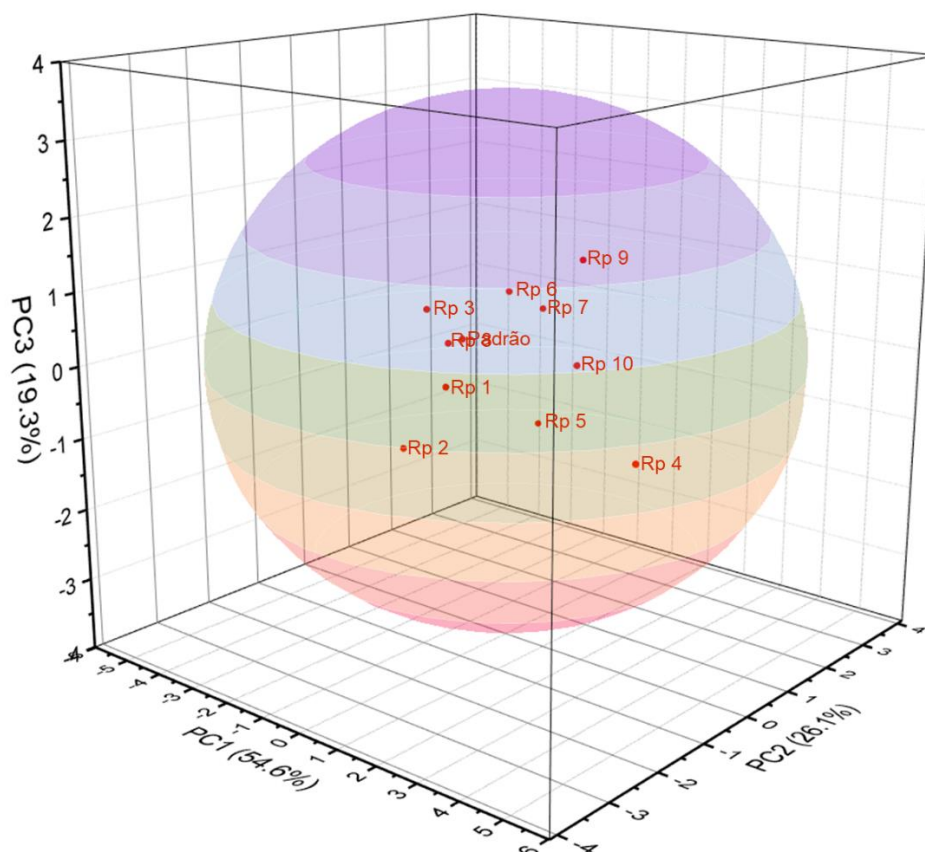


Figura 119: PCA das amostras de *R. purshiana*. apresentadas num gráfico tridimensional com a presença de três componentes principais. O círculo central apresenta a confiabilidade de 95%.

7.2.6 Avaliação da metodologia

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre o método proposto, para a metodologia desenvolvida nesse trabalho, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos da repetibilidade para os métodos propostos, utilizando o Teste *t* de Student e ANOVA (análise de variância), presumindo variâncias equivalentes e comparando-os com os resultados obtidos com a análise por UV-vis (QUINTELA *et al.*,

2010). Além disso, a comparação também foi realizada através de análise da PCA em ambas metodologias, bem como através de análise por LC-MS.

A análise por LC-MS pode ser verificada no apêndice D. Embora possa haver correspondência entre as análises, discrepâncias foram encontradas devido a utilização de outro equipamento e outra coluna cromatográfica.

Os resultados do teste t para as análises realizadas por UV-vis e comparadas com HPLC são apresentados na Tabela 68.

Tabela 68: Teste t pareado para a determinação dos marcadores químicos de *R. purshiana*. por HPLC e por espectrofotometria UV-vis.

	HPLC	UV
Média	62,34903293	59,50121212
Variância	7345,761009	6648,767229
Observações	33	33
Correlação de Pearson	6997,264119	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	64	
Stat t	0,138289911	
P(T<=t) uni-caudal	0,445222748	
t crítico uni-caudal	1,669013025	
P(T<=t) bi-caudal	0,0290445497	
t crítico bi-caudal	1,997729654	

Pode-se observar que em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada (0,96). Os resultados do Teste t de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$ (Tabelas 68), demonstraram não haver diferença significativa entre a metodologia proposta em comparação a metodologia por espectrofotometria UV-Vis. Tal fato, o valor de t calculado é menor que o valor de t tabelado.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a quantificação dos marcadores químicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 69.

Tabela 69: Análise da variância (ANOVA) das determinações da concentração dos marcadores por HPLC e UV-Vis.

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	P - Valor	F de significação
Entre grupos	1	133,8164	133,8164	0,019124	0,0445*	3,9990924
Dentro dos grupos	64	447824,9	6997,264			
Total	65	447958,7				

O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,0445 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. De fato, o valor de F calculado (0,019124) é menor que o valor de F crítico (3,9990924). A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabelas 69) demonstrou que não haver diferenças significativas entre as metodologias ($\rho = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias evidenciam que não há diferenças entre as metodologias, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a metodologia proposta é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *R. purshiana*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

A Figura 120 mostra o gráfico de cotovelo para as análises de correlação e agrupamento a partir das concentrações dos marcadores obtidos por HPLC e UV-vis.

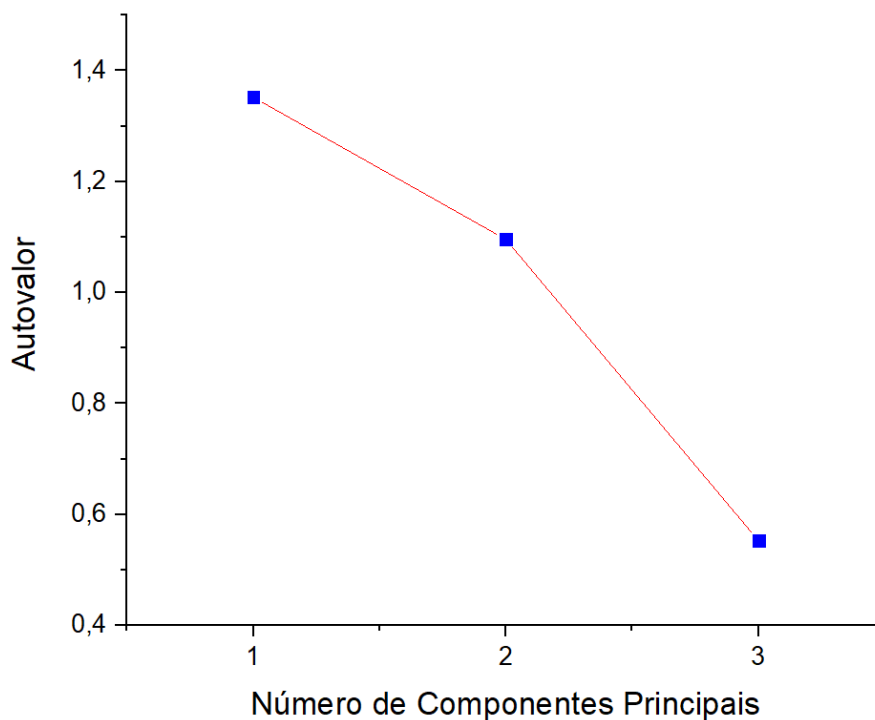


Figura 120: Gráfico de autovalor *versus* número de componentes principais.

A Tabela 70 apresenta a matriz de correlação dos autovalores.

Tabela 70: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	1,3523	45.08%	45.08%
2	1,09553	36.52%	81.59%
3	0,55218	18.41%	100.00%

De acordo com a Tabela 70, observa-se que as duas primeiras componentes principais formadas (PC1 45,08%; PC2 36,51%) apresentam autovalores igual ou superiores a 1. Essas duas componentes juntas permitem explicar 81,59% da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

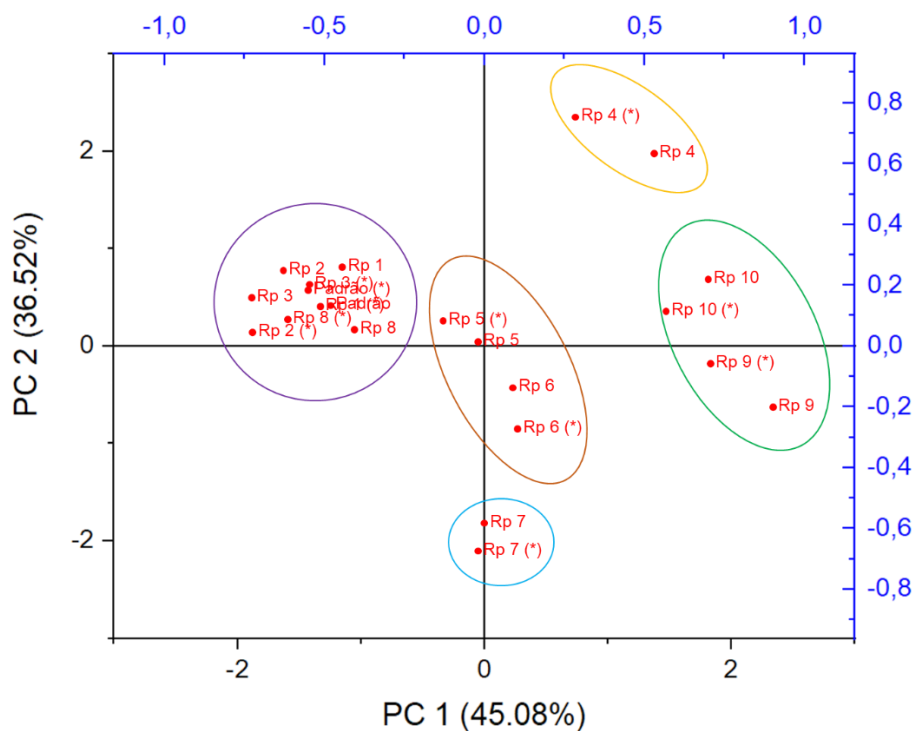
A Tabela 71 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 71: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2
Cascarosídeos	0,5127	0,66114
Emodina	0,74771	-0,03027
Aloe-emodina	-0,42198	0,74965

A análise da tabela 71 permite a verificação que para a componente principal 1, a concentração de emodina é o fator determinante de correlação, enquanto que a concentração de aloe-emodina são as responsáveis pelo agrupamento da PC2.

A partir dos valores encontrados de cada marcador em cada metodologia, realizou-se a análise por PCA e obteve-se os gráficos PC1 x PC2 (Figura 121). A partir da análise das Figuras 121, evidencia-se que não há diferenças discrepantes entre as análises, uma vez que as mesmas se agruparam conjuntamente. Além disso, observa-se a formação de cinco grupos em cada figura com os seus respectivos correspondentes.

**Figura 121:** Gráfico de pesos PC1 x PC2 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.



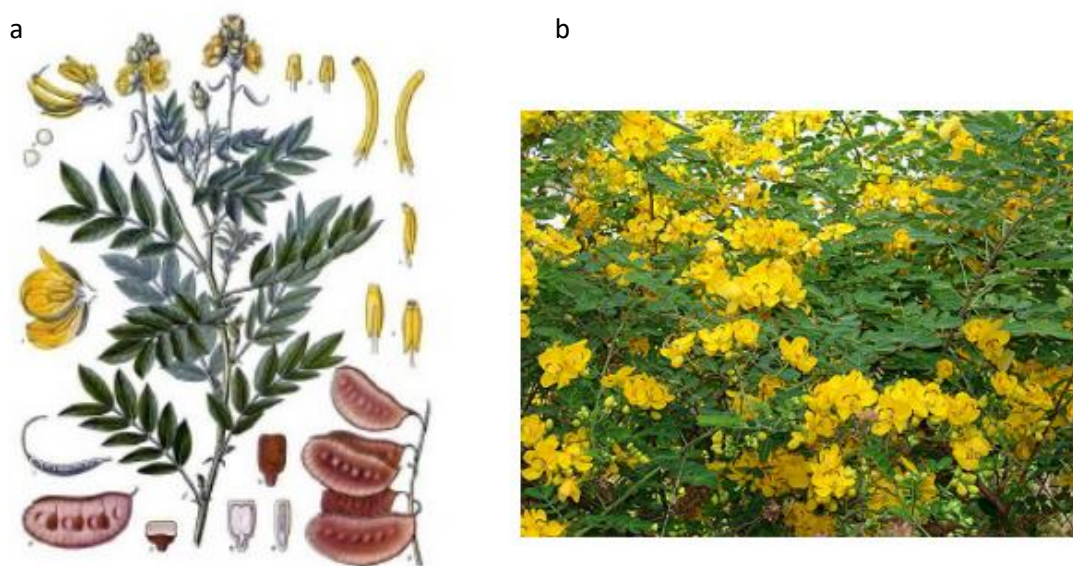
Fonte: <https://thesunlightexperiment.com/herb-summaries/senna-cassia-angustifolia>

Sene

8 SENE - *Cassia angustifolia*

8. 1 Aspectos botânicos e farmacognósticos do Sene (*Cassia angustifolia*)

A palavra ‘Sene’ é de origem árabe e corresponde ao nome popular para as espécies do gênero *Cassia* (Caesalpinaceae/Fabaceae) conhecidas desde a antiguidade pelas propriedades laxantes. As espécies mais difundidas comercialmente de Sene são a *Cassia angustifolia* Vahl, conhecida pelos nomes populares de Sene da Índia e Sene de Tinnevelly, e a *Cassia acutifolia* (ALONSO, 1998). A *Cassia angustifolia* é originária do sul da Península Arábica, Punjab e Somália; sendo introduzida posteriormente no sul da Índia, em especial nos territórios que lhe cunham a origem comercial, como o Sene de Tinnevelly. Consiste num arbusto cuja altura pode chegar a 1,5 metros, as folhas são paripenadas compostas, com 3 a 7 pares de folíolos estreitos ou arredondados, de cor verde pálido ou verde-amarelado (Figura 122), crescendo silvestre preferencialmente em zonas desérticas, e está atualmente disseminada em todas as regiões semiáridas do mundo (FARMACOPEIA PORTUGUESA 8ª Ed., 2005).



Fonte: Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005

Figura 122: Ilustração das estruturas vegetais (a) e do arbusto (b) da espécie *Cassia angustifolia*.

A importância do Sene como purgativo é evidenciada pela sua inclusão e permanência na maioria das farmacopeias correntes (MARTINDALE, 1977). Os laxantes de Sene originam-se de diferentes espécies, cujas origens geográficas usualmente

identificam os nomes comerciais. Entre sinônimos botânicos e comerciais para *C. angustifolia*, o manual “A Modern Herbal” descreve: *Sena alexandrina*, *Sena nubia*, *Cassia senna*, *Cassia lenitiva*, *Cassia lanceolata*, *Cassia officinalis*, *Cassia aethiopica*, *Sena acutifolia*, *Cassia augustifolia*, Sene Egípcio, Sene de la Palthe, Sene de Tinnevelly e Sene do leste indiano (GRIEVE,1931). Ainda, como um exemplo da variedade descritiva do Sene, pelo menos 17 sinonímias são registradas para esta *C. angustifolia* (PLANTAMED, 2012).

O fedegoso (*Cassia occidentalis* L.), uma exceção a esta nomenclatura tradicional, é nativa nas Américas (READER’S DIGEST BRASIL, 1999). No entanto, as farmacopeias brasileiras mais atuais referem-se à *Senna alexandrina* P. Miller, restringindo-se, em sua quinta edição, à descrição dos folíolos (*Sennae folium*), cujo material, quando dessecado, constitui a droga vegetal (BRASIL, 2010a). Tradicionalmente, tanto os folíolos (neste caso, a droga vegetal não consiste da folha inteira, mas dos folíolos removidos) quanto às sementes (vagens) são utilizados, e de modo geral, a composição de derivados antracênicos é semelhante nos folíolos e folículos. No entanto, o teor total de glicosídeos antranóides é maior nos frutos (5%) que nos folíolos (3%); em contrapartida, estes últimos possuem maior teor em derivados da aloemodina, às quais se chegou a atribuir efeitos terapêuticos mais acentuados. Assim, na mesma dose, folíolos apresentam efeito laxante mais intenso que os frutos. Tanto as folhas quanto as vagens são colhidas e secas para serem empregadas como laxantes. Infusões (chá de Sene), tinturas e xaropes são também utilizados. A droga age irritando o intestino, o que acelera a sua motilidade. As folhas de Sene são mais comumente usadas na forma de chás, mas os extratos são frequentes em uma variedade de produtos laxativos. Como drogas farmacopeicas, as folhas e as vagens de Sene são denominadas *Sennae folium* e *Sennae fructus*, respectivamente, com o indicativo de ‘promover movimentos intestinais moderados e amolecer as fezes, por exemplo, em pacientes com fissuras anais ou hemorroidas, antes de procedimentos diagnósticos, ou após alguma cirurgia ano-retal’ (SCHULZ *et al.*, 2004).

Já na primeira versão da Grande Farmacopeia Brasileira, Chernoviz menciona o Sene como um dos purgativos mais seguros e mais frequentemente empregados, sendo que, para evitar cólicas eventuais, pode ser associado a substâncias aromáticas, como a canela, erva-doce, gengibre, ou outros purgantes menos energéticos (CHERNOVIZ, 1996). O Sene tem a vantagem de produzir o efeito purgativo quase imediatamente depois de sua aplicação. Apesar de tudo, deve-se ter cautela, uma vez que as doses muito

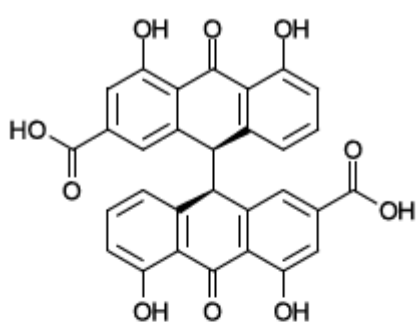
frequentes ou excessivas podem resultar em sintomas de lesão de fígado (READER'S DIGEST BRASIL, 1999).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), a droga vegetal é constituída dos folíolos dessecados contendo, no mínimo, 2,5% de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B, e 0,6% de senosídeo B e 0,5% de senosídeo A; não devendo ser utilizados antes de um ano após a colheita. Isto está em acordo com *The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines* (THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1998) que preconiza um conteúdo mínimo de 2,5% de glicosídeos hidroxiantracênicos, calculados com referência a senosídeos B para a droga seca.

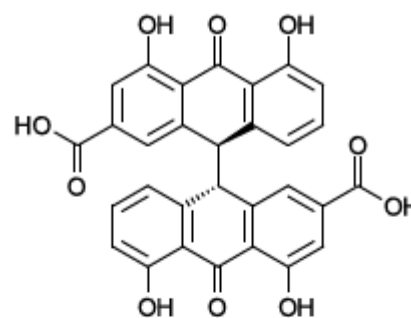
Além deste detalhe, a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010) atualizou os requerimentos para o *Sennae folium* preconizando os requerimentos para os parâmetros abaixo:

- ♣ Características organolépticas: sabor e odor.
- ♣ Descrição botânica
- ♣ Macroscópica: aspectos botânicos relacionados aos folíolos.
- ♣ Microscópica: aspectos micromorfológicos e cortes histológicos do material vegetal (folíolos).
- ♣ Descrição microscópica do pó da planta: coloração, aspectos micromorfológicos, diferenciação entre folíolos e raques foliares.
- Identificação:
 - Testes colorimétricos.
 - Microsublimação e colorimetria específica.
 - Cromatografia em camada delgada com eluentes e reveladores químicos específicos de extratos alcoólicos pré-definidos da droga vegetal; medidas de Rf.
- Ensaio de Pureza:
 - Material estranho: sujidades e raques foliares.
 - Conteúdo de água.
 - Cinzas totais.
- Doseamento dos derivados hidroxiantracênicos: espectrofotometria; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

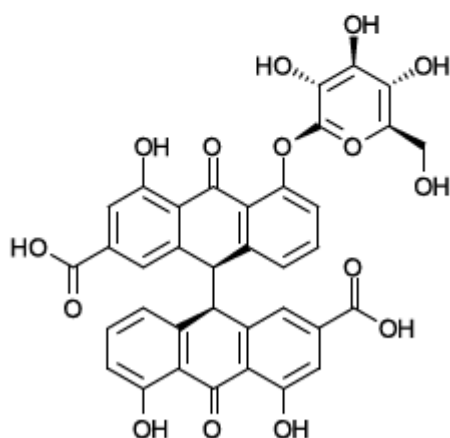
As principais antraquinonas constituintes do Sene são os glicosídeos hidroxiantracênicos diméricos cujas agliconas são compostas de emodina de aloés e/ou de reína. A maior concentração é de senosídeos A e B (classe das reínadiantronas), par de estereoisômeros cujas agliconas (senidina A e B) são diantronas derivadas de reína. O conteúdo químico do Sene também inclui pequena quantidade de glicosídeos monoméricos e antraquinonas livres, entre as quais se destacam aloemodina, crisofanol, reína (ALONSO, 1998); além de pequenas quantidades de flavonoides e outros derivados minoritários do naftaleno (WHO, 1999), demonstrados na Figura 124. Os senosídeos A e B são substâncias isoméricas amarelas e cristalizáveis, solúveis em álcool e pouco solúveis em água; constituindo-se na base do controle químico da qualidade da droga vegetal, e medicamentos derivados de Sene.



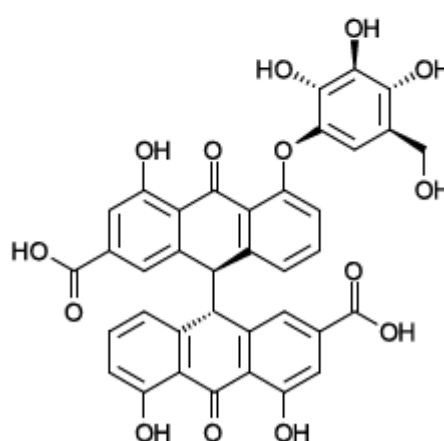
Senidina A



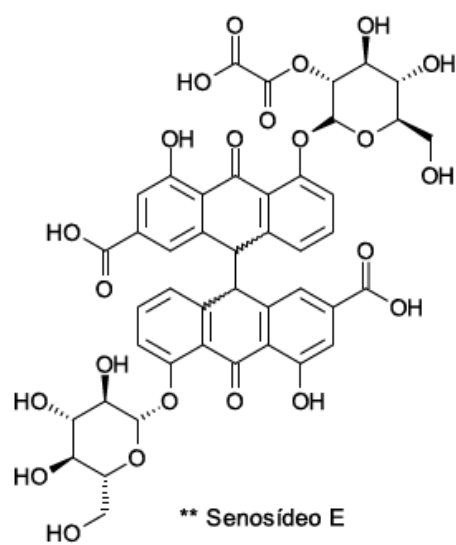
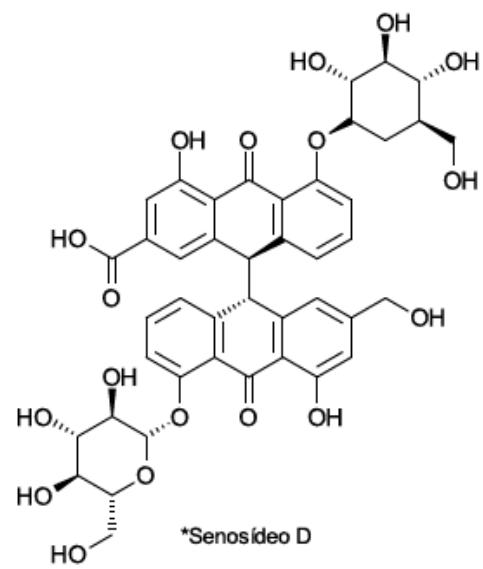
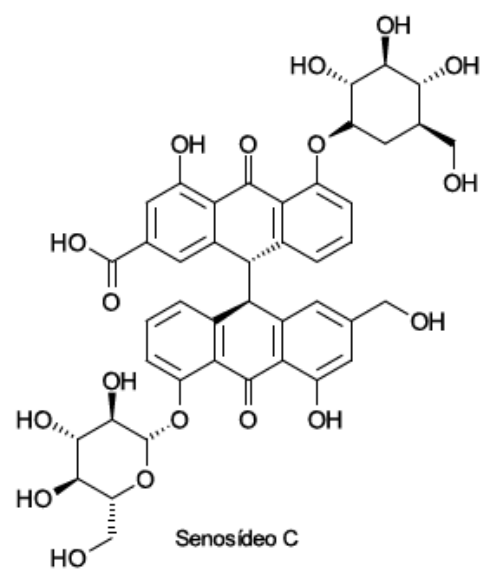
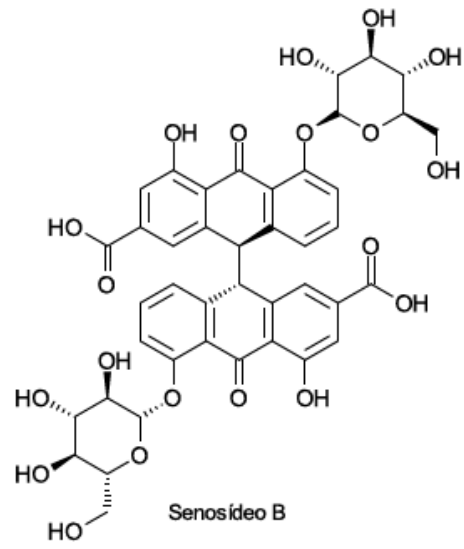
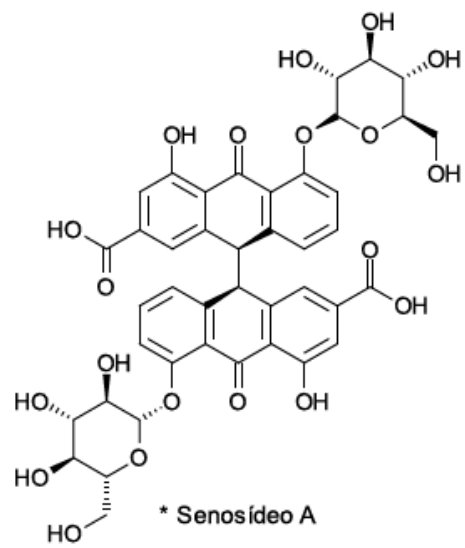
Senidina B

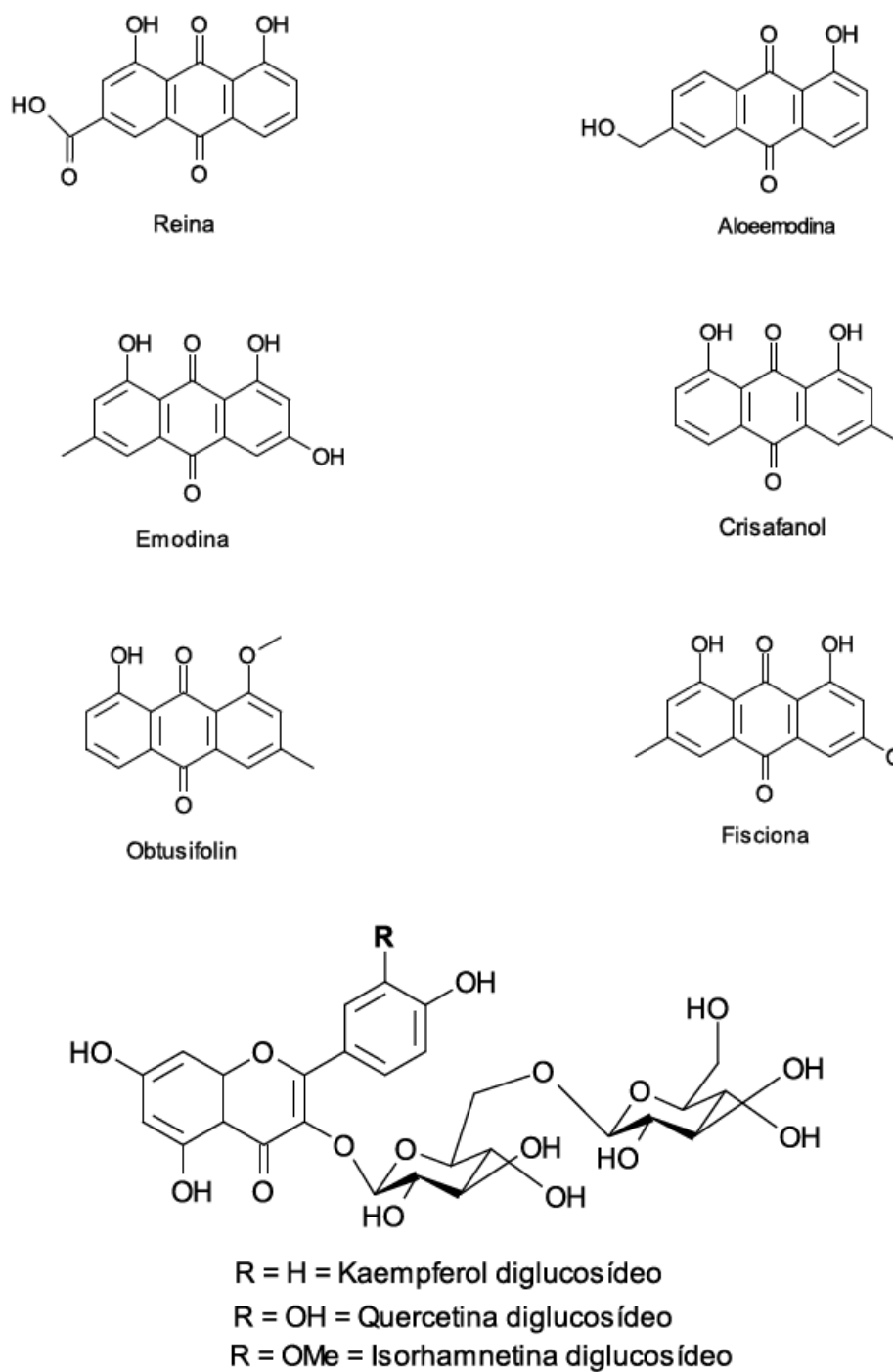


Senidina A monoglucosídeo



Senidina B monoglucosídeo





* **Senosídeo A1** = isômero ótico de Senosídeo A; **Senosídeo D1** = isômero ótico de Senosídeo D.

** Senosídeo **E** = literatura não especifica estereoquímica da ligação dimérica C10-C10.

Figura 123: Principais substâncias presentes no Sene (*Cassia angustifolia*).

A partir da definição oficial de fitoterápico como o medicamento obtido a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros) (BRASIL, 2010b) e das possíveis modalidades de registro de fitoterápicos, o Sene está entre aqueles aos quais se permite o registro simplificado; lembrando que os compostos vegetais devem estar em formas padronizadas, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus principais ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna conforme a RDC 14 (BRASIL, 2010b).

O quadro abaixo resume as informações descritas na Instrução Normativa no 5 (BRASIL, 2008), que suportam a inclusão do Sene na Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado.

Quadro 8: Sene na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado Fonte: Instrução Normativa nº5 (BRASIL, 2008)

Nomenclatura botânica	<i>Senna alexandrina</i> Mill., <i>Cassia angustifolia</i> Vahl ou <i>Cassia senna</i> L.
Nome popular	Sene
Parte usada	Folhas e frutos
Padronização/Marcador	Derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B
Derivado de droga vegetal	Extratos/tintura
Indicações/Ações terapêuticas	Laxativo
Dose Diária	10 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B
Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica

8.2 Extratos secos de Sene

Estabelecer a dose adequada e eficiente é provavelmente o aspecto mais controverso da fitoterapia contemporânea. Muitas vezes é necessário administrar muitas cápsulas ou comprimidos contendo a droga vegetal pulverizada (pó da planta) para atingir a dose terapêutica o que acarreta a não aderência do paciente ao tratamento. Uma solução para simplificar o esquema posológico é a utilização de extrato seco padronizado, onde

os componentes químicos do vegetal são ajustados em níveis concentrados e conhecidos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A padronização é utilizada para assegurar lote a lote as especificações do teor de ativos, em relação aos quais os ensaios clínicos de segurança e eficácia foram estabelecidos e documentados (FERREIRA, 2010).

Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Estes, geralmente, apresentam no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como percentagem de massa. Os extratos secos padronizados são ajustados para ter um conteúdo definido de constituintes, usando materiais inertes adequados (THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1998). Os extratos secos, quando preparados adequadamente, apresentam inúmeras vantagens frente à forma fluida convencional, tais como: menor espaço necessário para o armazenamento, maior concentração, estabilidade e facilidade de padronização dos princípios ativos presentes nas plantas, o que aumenta o valor agregado do produto (SOUZA, 2007). No caso do Sene, um levantamento no CENTRAX BULAS (2016) aponta três medicamentos fitoterápicos contendo o extrato seco em cápsulas duras de gelatina disponíveis no mercado. Estes possuem em geral as composições abaixo:

Medicamento 1 Cada cápsula contém: Extrato seco de *Cassia angustifolia* Vahl, (Sene) 100 mg Excipiente (Amido) q.s.p 1 cápsula. Tendo o extrato padronizado em 10-11% de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeos B. Cada cápsula contém 10 mg de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeo B.

Medicamento 2 Cada cápsula contém: Extrato seco de *Cassia angustifolia* Vahl, (Sene) 80 mg Excipiente (Amido) q.s.p 300 mg. Tendo o extrato padronizado em 35% de senosídeos totais. Cada cápsula contém 28 mg de senosídeos totais.

Medicamento 3 Cada cápsula contém: Extrato seco de *Cassia angustifolia* Vahl, (Sene) 350 mg Excipiente (Amido) q.s.p 1 cápsula. Tendo o extrato padronizado em 2,5% de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeos B. Cada cápsula contém 8,75 mg de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeo B.

No entanto, apesar de apresentarem um baixo teor de umidade, e na manipulação de fitoterápicos serem utilizados preferencialmente para o preparo de pós, cápsulas e comprimidos (BRASIL, 2005), os extratos secos ainda são higroscópicos, devendo ser adequadamente acondicionados com dessecantes até sua utilização ou processamento.

8.3 Análise química dos derivados de Sene

A primeira análise para a presença de antraquinonas em plantas foi desenvolvida por Hugo Bornträger, em 1897, na Alemanha, quando buscava um método rápido e preciso para detectar adulterações em cervejas e licores, que durante a entressafra de lúpulo, tinham seus princípios amargos substituídos por extratos de babosa (*Aloe* sp.), e cujo consumo contínuo provocava hepatotoxicidade nos consumidores (BORNTRÄGER, 1880). O procedimento original consistia basicamente em extrair o material em estudo com éter sulfúrico, seguido de tratamento deste extrato com amoníaco. Os ânions gerados pelas estruturas antraquinônicas livres produziam uma coloração avermelhada característica, que era revertida pela adição de ácido. No decorrer do século XX, a descoberta de Bornträger (1880) foi adaptada e amplamente utilizada para várias outras espécies utilizadas com fins medicinais, entre elas Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana* L.), Ruibarbo (*Rheum palmatum* L.), Frângula (*Rhamnus frangula* L.) e Sene (*Cassia angustifolia* Vahl.).

O procedimento aplicado às drogas vegetais foi gradualmente variado, incluindo principalmente a introdução inicial de uma hidrólise oxidativa ácida de moléculas diméricas como os senosídeos, a fim de garantir o cômputo das hidroxiantraquinonas glicosiladas (não extraídas pelo éter) no resultado final da análise (LONGO e MEINARDI, 1965). Em resumo, tanto o método aplicado às folhas quanto aos produtos derivados do pó de Sene fundamentam-se na sequência de extração em meio aquoso, remoção das geninas antraquinônicas, clivagem oxidativa das di-antrons e hidrólise ácida, para resultar nas geninas antraquinônicas monoméricas. Estas são então determinadas colorimetricamente, pela reação de Bornträger; sendo os glicosídeos totais usualmente calculados sobre o teor de senosídeo B (SCHULZ *et al.*, 2004). Este procedimento consolidou-se no método que hoje integra a maioria das farmacopeias do mundo, e pode ser resumido no esquema da Figura 124 (FARMACOPEIA BRASILEIRA 4^a ed., 1988):

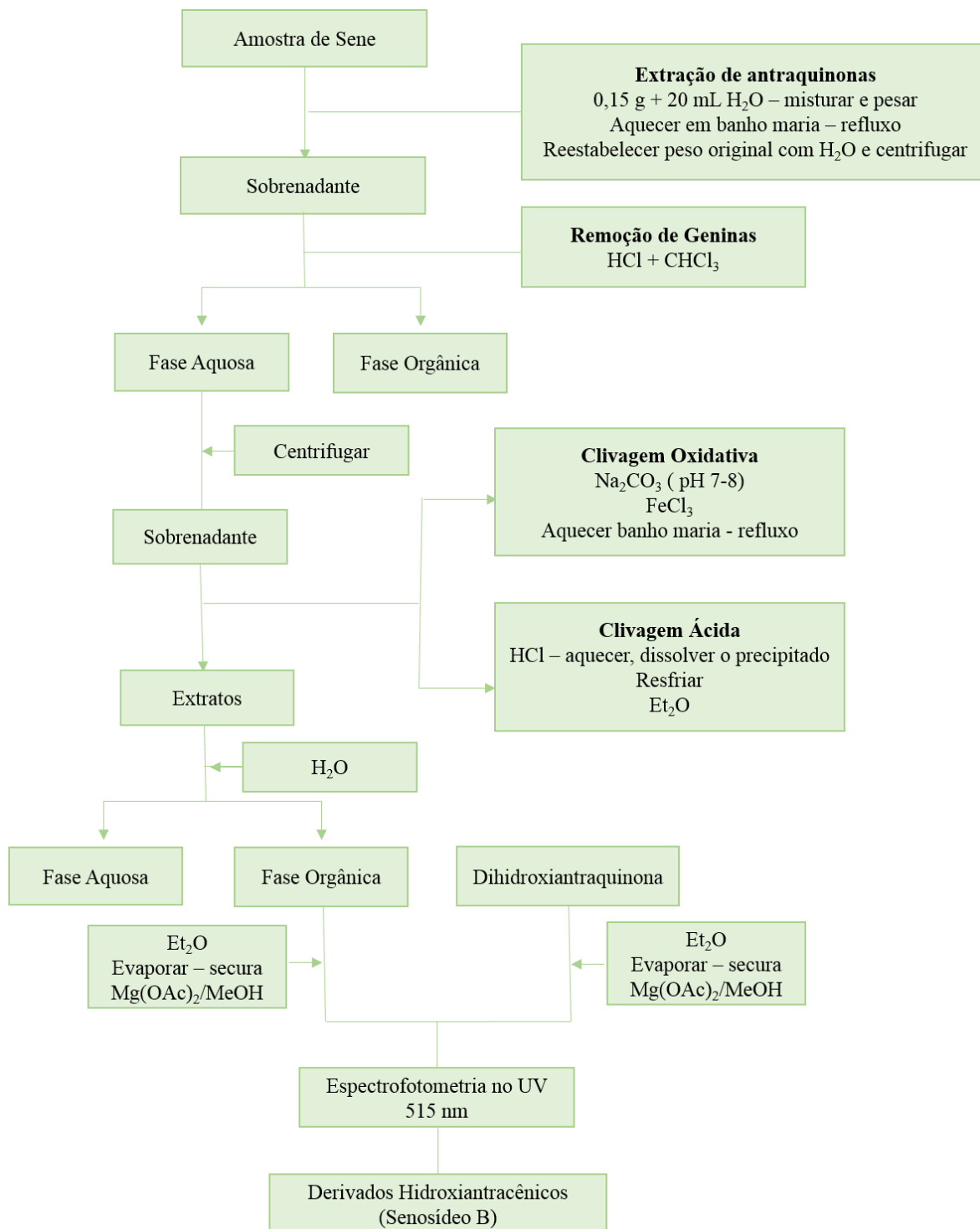


Figura 124: Procedimento de análise de antraquinonas de *Cassia angustifolia* presente na farmacopéia brasileira.

Apesar de adequar-se à questão farmacopeica da garantia da eficácia pelo conteúdo químico total de hidroxiantraquinonas, este procedimento baseado na formação de derivados coloridos pela ação de *álcali* sobre as agliconas liberadas não é específico, desde que não distingue entre os senosídeos isoméricos A e B, mas sim fornece o conteúdo total de senosídeos. Além disso, o risco persiste na exatidão da análise, desde que bi-antrons C-C (como os senosídeos) podem não ser completamente oxidadas para antraquinonas (LEMLI, 1965; 1986). Estes motivos impulsionaram o aperfeiçoamento dos métodos mais diretos para analisar o conteúdo químico em Sene (e outras drogas vegetais) – como a colorimetria sobre o conteúdo original da droga/extrato, e a aplicação de CLAE.

O desenvolvimento de ensaios precisos para o controle químico do Sene e de seus fitoderivados permaneceu, durante longo tempo, retardado devido à imprecisão do conhecimento sobre o princípio ativo na droga, (HABIB, 1980). Convém mencionar também que os métodos de análises envolvendo o conteúdo químico de espécies de Sene tiveram o seu desenvolvimento pautado na droga vegetal. Desde os primeiros estudos científicos até meados de 1960, os esforços foram concentrados na questão do controle de qualidade farmacêutico da droga disponibilizada para a população. Curiosamente, esta mesma dificuldade, associada aos desvios inerentes na precisão do controle botânico, levaram Fairbain *et al.* (FAIRBAIRN e SALEH, 1953; FAIRBAIRN *et al.*, 1958; FAIRBAIRN e SCHRESTHS, 1967; FAIRBAIRN e MOSS, 1970), complementados posteriormente por Kobashi *et al.* (1980) e Dressen *et al.* (1981), a desenvolver modelos de controle biológico para verificar os efeitos de extratos de Sene, frações, substâncias isoladas e misturas destas, quando ensaiados *in vitro* sobre bactérias dos tratos intestinais de ratos, camundongos e humanos; assim como medidas das variações nos períodos de defecação e consistência das fezes de animais tratados. A maior parte destes ensaios foi realizada concomitantemente à aplicação da cromatografia de papel a estes metabólitos, aplicada inicialmente por Shibata *et al.* (1950); o que foi decisivo para os avanços alcançados nas duas décadas seguintes. Estes avanços incluíram uma maior precisão na identificação estrutural dos constituintes antraquinônicos em espécies de *Cassia* (FRIEDRICH e BAIER, 1973; FAIRBAIRN e SCHRESTHS, 1967), assim como as quantificações dos princípios purgativos nas plantas (BRENDDEL e SCHNEIDER, 1974; BRENDDEL e BERGER, 1974).

Os métodos analíticos para derivados de antraceno em drogas vegetais, utilizados até a metade do século passado, foram revisados por Kraus (1959), que racionalizou os

avanços obtidos até então com aplicação de fluorimetria, polarografia e cromatografia e eletroforese em papel, cromatografia em coluna, e tendo como base estudos colorimétricos das substâncias. Uma cuidadosa revisão realizada por Friedrich e Baier, sobre os resultados dos estudos então realizados até 1973, complementados com um exaustivo trabalho com base em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), resultou na elucidação do rol de substâncias presentes nos extratos ativos de Sene (FRIEDRICH e BAIER, 1973). O autor deixou patente que, embora a base científica de validação do Sene admita a medida do teor de senosídeos como critério de qualidade da matéria-prima e produtos derivados, a composição antraquinônica dos seus extratos é mais complexa do que a simples mistura destas substâncias.

O primeiro estudo dos constituintes antraquinônicos isolados do Sene foi realizado por Stoll *et al.* (1949), que identificaram os senosídeos A e B, seguido do isolamento da réina (que já era conhecida) a partir da oxidação de componentes da espécie brasileira *Cassia alata* L. (HAUPTMANN e NAZÁRIO, 1950). Dois novos glicosídeos antraquinônicos, assim como aloeeomodina e traços de emodina glucosídeo foram detectados nas vagens de *C. angustifolia* por Khorana e Sanghavi (1964) e, posteriormente, o senosídeo E foi isolado do ruibarbo por Oshio *et al.* (1972).

Estudos adicionais (FRIEDRICH e BAIER, 1973) contribuíram para aumentar o conhecimento da presença de hidroxiantraquinonas, e seus derivados de oxidação e clivagem em drogas vegetais; e o isômero ótico do senosídeo A (senosídeo A1) foi identificado nas vagens de *C. senna* (CHRIST *et al.*, 1978). Com relação aos constituintes químicos, duas espécies de *Cassia* foram rapidamente revisadas por LemLi (1986), que também apontou a questão da isomerização nos senosídeos dímeros. A partir do estabelecimento das estruturas das substâncias, deslanchou tanto o desenvolvimento das análises químicas de hidroxiantraquinonas quanto a proposição de métodos mais rápidos e eficientes para extrações de componentes específicos de plantas contendo este tipo de substâncias (LADDHA, 2009).

O diagnóstico e a detecção colorimétrica das antraquinonas em vegetais evoluiu conjuntamente com os procedimentos utilizados para a separação e identificação destas substâncias, quando originalmente se empregavam meios químicos envolvendo clivagem, hidrólise e extrações em diferentes pHs (KUSSMAUL e BECKER, 1947). O método espectrofotométrico para análise dos senosídeos foi desenvolvido por Auterhoff e Kinsky (1965) e mais tarde aperfeiçoado por Brendel e Schneider (1974), o que permitiu corrigir os resultados obtidos originalmente muito altos para o teor de senosídeos.

A fidelidade dos resultados analíticos no acesso do conteúdo de antraquinonas diméricas ainda avançou mais com o estudo de Habib e El-Sebakhy (1980), por intermédio de um procedimento mais elaborado no preparo da amostra, no sentido de diferenciar os monômeros carboxílicos presentes, principalmente os glicosídeos de reína (SCHULZ *et al.*, 2004).

O estabelecimento do método colorimétrico, até sua consolidação nas farmacopeias, ainda passou por muitas etapas de aperfeiçoamento, desde a adequação contínua do preparo da amostra a ser analisada, até a proposição de variantes técnicas e consequentes validações analíticas. Estas últimas derivaram principalmente da introdução paulatina de novas tecnologias nas análises orgânicas, considerando tanto novos equipamentos, novas e mais eficientes fases cromatográficas, reveladores químicos inéditos para antraquinonas, etc. (LAWRENCE e FREI, 1973).

Neste contexto, também contribuíram o surgimento de novos métodos e adaptações inéditas de métodos existentes, como CLAE associada a análises densitométricas (DEQUEKER *et al.*, 1964; SHAH *et al.*, 2000; AKTAR *et al.*, 2008), cromatografia associada à partição iônica (KOMOLAFE, 1978; SAGARA *et al.*, 1987), eletroforese (ZWAVING, 1974; LEMMENS, 1977) e outras (KRAUS, 1959). Todavia, de uma maneira geral, a maioria dos métodos desenvolvidos neste contexto de caracterização e quantificação das hidroxiantraquinonas sempre apresentou uma forte dependência da etapa de preparo das amostras para análise; considerando que essas contêm misturas de glicosídeos e substâncias não glicosiladas (com diferenças marcantes de solubilidades) igualmente importantes para a eficácia dos fitocomplexos de Sene. Estes motivos impulsionaram a busca por consolidar meios mais diretos para analisar o conteúdo de senosídeos em Sene (e outras drogas vegetais) – como a aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

Neste contexto, embora a metodologia colorimétrica, com base na determinação do teor de senosídeos, ainda seja o principal suporte para o controle de qualidade do Sene nas farmacopeias internacionais, a técnica de CLAE vem sendo gradualmente implantada como método preconizado de análise farmacopeica. Esta novidade foi recentemente incorporada na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

A aplicação da técnica de CLAE aos constituintes de espécies do gênero *Cassia* desenvolveu-se entre meados de 1970 e 1980 (RAI *et al.*, 1975; GÖRLER *et al.*, 1979; HAYASHI *et al.*, 1980; KOMOLAFE, 1981; DUEZ *et al.*, 1984). Como para o método

colorimétrico, as análises de hidroxiantraquinonas por CLAE evoluíram nas últimas décadas de maneira passo e passo com os ganhos tecnológicos dos equipamentos e das colunas de separação cromatográfica. Uma breve revisão da literatura (já excluindo as referências acima citadas) dos estudos mais pertinentes sobre este assunto está resumida no Quadro 9.

Somado aos estudos de isolamento e identificação, assim como a maior disponibilidade dos componentes antraquinônicos do Sene, a técnica de CLAE se estabeleceu gradativamente como um método quantitativo. Muitos artigos sobre quantificação de antraquinonas glicosiladas surgiram nas duas últimas décadas do século passado (Quadro 09), culminando mais recentemente com a aplicação da técnica de CLAE acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) (STUPPNER e STURM, 1996; LIAO *et al.*, 1998; DÁVID *et al.*, 2009). Esta técnica hifenizada não só contribuiu para estabelecer um perfil químico mais preciso para a droga vegetal (DEMIREZER *et al.*, 2011), como também para identificar a presença de antraquinonas inéditas nos seus extratos e frações (TERREAUX *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2012).

Entre as modalidades de detecção mais utilizadas está a ionização por eletronebulização (IEN), em inglês *electrospray ionization*, que representa a fonte de ionização do analito localizada na interface do sistema. Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação é favorecida em compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados. A ionização ocorre diretamente na solução, o que evita a degradação dos compostos sensíveis. Uma variação desta técnica é a ionização química à pressão atmosférica (IQPA), em Inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, que pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à IEN, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa, e também porque IQPA é aplicável a vazões maiores do eluente cromatográfico do que as suportadas por IEN. Tanto na IEN quanto na IQPA ocorre a denominada ionização suave, isto é, são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo, ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito. Nestas fontes de ionização, mais comumente na IQPA, também pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $HCOO^-$ e CH_3COO^- , que são espécies iônicas presentes nas fases móveis provenientes dos modificadores adicionados a elas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Quadro 9: Alguns exemplos de separação de senosídeos de *C. angustifolia* por CLAE.

Equipamento/coluna	Condições de análise	Material analisado	Referência
Sistema CLAE + bomba SP-800-150SD, detector UV UVILOG-5III, válvula de injeção Rheodyne Model 7125, registrador Seconic SS-250f.	Coluna Sensyu-Pak coluna (25cm x 8,0mm) com Nucleosil 5 N(CH ₃) ₂ . Fase móvel (isocrático): THF-água-HOAc (8:2:1), vazão 3,5 mL/min, detecção 280 nm.	Senosídeos A, B, C e E do extrato metanólico de ruibarbo.	Oshima & Takahashi, 1983
Bomba 6000 A, e injetor U6K Waters, detector espectrofotômetro mod 450, registrador Omniscibe Waters.	Coluna µl Bondapak TM/C 18 Waters, granulometria 10 µm. Fase móvel (isocrático) 100 mL sol <i>t</i> -BuNH ₄ ⁺ OH ⁻ 0,1N + 300 mL MeOH + 1 L água, ajuste de pH 7,5 com H ₃ PO ₄ , vazão 1,5 mL/min. Detecção 254 nm.	Padrões comerciais de senosídeos A e B: medida de isomerização com luz em 150 dias: sen B → sen A → reína.	Merle <i>et al.</i> , 1984
Sistema (Waters): duas bombas Mod 510, controlador automático de gradiente Mod 680, DAD Mod 991.	Coluna Cosmosil 5C ₁₈ (5µm, 25 cm x 4,6 mm), pré-coluna µ Bondapak C ₁₈ Millipore. Fase móvel (gradiente linear) A+B [A = tampão: CH ₃ CN 9:1 (tampão: 0.02M NaOAc e 0.4197 M HOAc)]; B = MeOH:CH ₃ CN:1%HOAc 9:9:2, vazão 0,8 mL/min. Detecção em 280 nm.	Fitoterápico chinês (Hsiao-cheng-chi-tang) contendo sen A, sen B, emodina, flavonoides, outros	Sheu e Lu, 1995
Sistema (Waters): duas bombas W 510 S Waters, válvula de injeção Rheodyne 7125, injetor automático W 717, DAD W 996, Workstation Millenium.	Coluna inox com cartucho Nucleosil 5 C ₈ (5µm, 250x4 mm), 20 °C. Fase móvel (gradiente não linear) A+B [A = 0,02 M hidrogêniofosfato com H ₃ PO ₄ até pH 2; B = CH ₃ CN. Detecção em 435 nm (antraquinonas) e 270 nm (biantranilas).	Extratos de frutos e folhas de <i>S. angustifolia</i> e <i>S. acutifolia</i> contra padrões comerciais de 5 antraquinonas + 2 glicosídeos (quali) + 9 senosídeos, agliconas e monoglicosídeos A, A1, C, D, D1 (quali) + sen B (quanti)	Metzger e Reif, 1996

Sistema modular Waters com bomba M-6000, injetor U6K, detector λ variável M-450 e módulo de dados M-730.	Coluna μ l Bondapak C18 (300 x 3,9mm, partícula 10 μ m). Fase móvel: MeOH:água:HOAc:THF 60:38:2:2 v/v) (isocrático), vazão 0,8 mL/min, 25 °C. Detecção em 254 nm.	Sementes de <i>C. angustifolia</i> : senosídeos A e B. Medidas de recuperação.	Verma <i>et al.</i> , 1996
Sistema modular Waters com duas bombas Mod 501, injetor U6K, controlador automático de gradiente Mod 680, degasificador <i>in line</i> , DAD W 996, Workstation Millenium 2010.	Coluna Symetry C18 Waters (150 x 4,6mm, 5 μ m). Fase móvel (gradiente linear binário) A+B [A = MeOH, HOAc 20:80:0,1 v/v, pH 4,0]; B = 80:20:0.1, pH 4,0], 25 °C. Vazão 0,6 mL/min (20 min)+1,0 mL/min (30 min). Detecção em 285 nm.	Folhas e vagens de <i>C. angustifolia</i> . Análise quantitativa de sen A e sen B contra curvas de calibração com padrões comerciais.	Bala <i>et al.</i> , 2001
Não indicado.	Coluna de sílica octadecilsilanizada (150mm x 3,9mm, 4 μ m). Fase móvel: A+B (isocrática intercalada com períodos de gradiente linear) [A = água:TFA (100:0,08); B = CH ₃ CN] vazão 0,9 mL/min. Detecção 270 nm.	Quantificação de senosídeos A e B nas amostras com referência a curva analítica contendo sen A + sen B.	Farmacopeia Brasileira 5 ^a Ed. 2010
System Agilent 1100 com sistema de bombeamento Quatpump G1311A, DAD UV-VIS G1315B, degasificador G1322A.	Otimização inicial de condições pela separação e tempo de análise, incluindo tipo de coluna e fase móvel: coluna C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5 μ m), temperatura ambiente. Fase móvel: CH ₃ CN:água+0.1% H ₃ PO ₄ (gradiente). Vazão 1,0 mL/min. Detecção em 278 nm. *	Quantificação simultânea de 8 antraquinonas (glucosídeos e agliconas; mas não senosídeos), usando como padrões substâncias isoladas e certificadas de <i>C. obtusifolia</i>	Xu <i>et al.</i> , 2012

8.4 Resultados e Discussão

A determinação das substâncias ativas é um critério importante para a padronização da fitoterapia. A fitoequivalência é importante para comprovar a segurança e eficácia da fitoterapia. Nos últimos anos, o método de impressão digital tem sido um método importante para a padronização de fitoterápicos (YANG *et al.*, 2015). A EMA (Agência Europeia de Medicamentos) e a FDA (Food and Drug Administration) sugerem o método das impressões digitais para avaliar a compatibilidade da fitoterapia com o extrato padrão. A mudança da concentração de componentes provoca uma atividade terapêutica diferente, portanto, o método de impressão digital é um método válido e eficaz para o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. Chás comerciais de emagrecimento contêm folhas de sene, mas não está claro quais são as espécies de *Cassia* (DEMIREZER *et al.*, 2011).

8.4.1 Análise de senosídeos

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, HPLC), a determinação de senosídeos foi realizada utilizando-se padronização externa. Todavia, a determinação de senosídeos, A, B, foi avaliada através da co-injeção das amostras de *Cassia angustifolia* através da adição de padrão na amostra.

O primeiro passo para análise em HPLC é separar, com boa resolução, todos os compostos de interesse presente em uma solução padrão. Este estudo consiste em pesquisar qual a melhor fase móvel e sua composição, para obtenção de picos resolvidos.

Estabelecido as condições de separação para os composto padrões presentes em *C. angustifolia*, não foi difícil otimizar as condições, para obter os valores de k aceitáveis. Para isso foi utilizado uma programação de gradiente de eluição. Após alguns ensaios chegou-se a uma programação ideal do gradiente de eluição descrita anteriormente. O cromatograma da Figura 125, mostra a separação de todos os compostos em tempo de análise menor que 30 min. A Tabela 72 apresenta os parâmetros de separação obtidos.

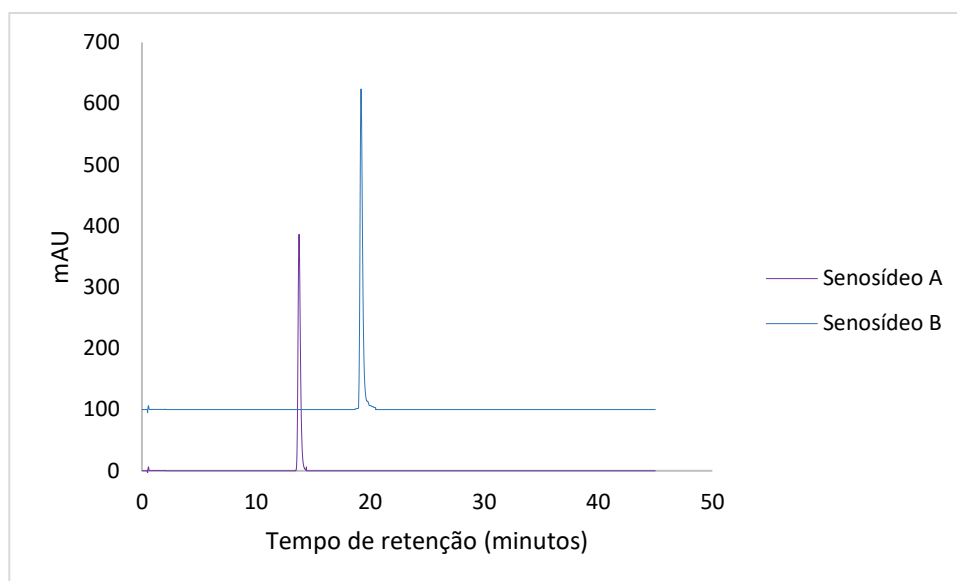


Figura 125: Cromatograma dos padrões utilizados como marcadores para *C. angustifolia*: senosídeo A (lilás) e senosídeo B (azul).

Tabela 72: Combinação de eluição das amostras padrões de *C. angustifolia*: senosídeo A e senosídeo B.

Amostra	t_R	k	α	R_s	N
Senosídeo A	13,75	27,5	-	-	75625,00
Senosídeo B	19,2	38,4	1,4	2,8	147456,00

* t_R = tempo de retenção (minutos); k = fator de retenção e α = fator de separação ou seletividade, R_s = Resolução, N = Numero de pratos teóricos.

A partir dos valores de k e R_s obtidos com os valores exigidos pela literatura, (SNYDER *et al*, 1997), as condições para a separação dos compostos mostrou-se eficiente. Isto significa que, nestas condições os compostos analisados estão resolvidos, ou seja, otimamente separados. Na presença de interferentes, analisando amostras reais, estes fatores devem continuar constantes. A Figura 126 apresenta os padrões para análise de *C. angustifolia* sumarizados em uma única análise.

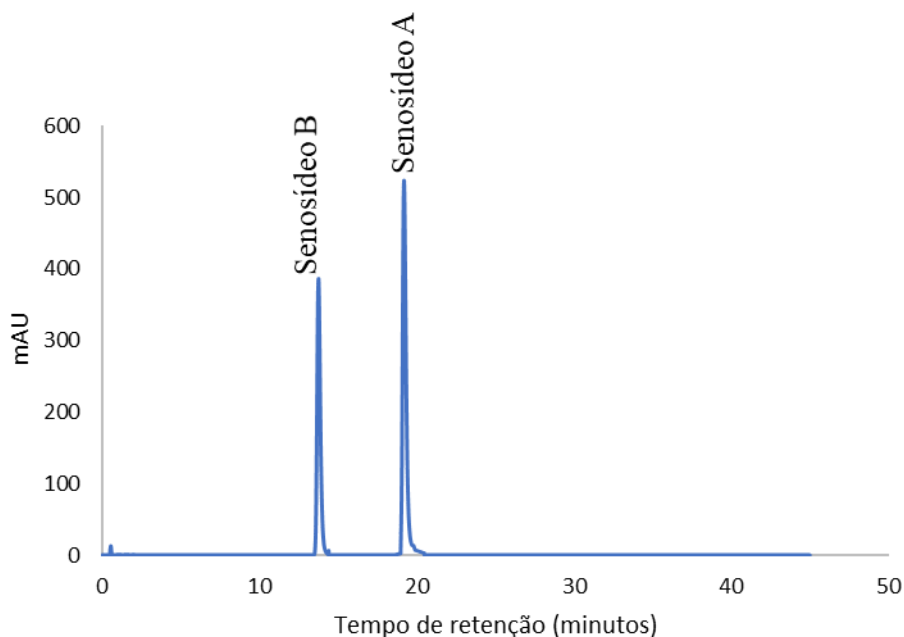


Figura 126: Espectro dos padrões combinados de *C. angustifolia*, Senosídeo A e Senosídeo B, respectivamente.

A presença de ácidos na fase móvel é importante para evitar a ionização dos grupos hidroxilas presentes em compostos fenólicos, permitindo uma melhor separação e simetria do pico (CARVALHO *et al.*, 2009). O ácido trifluoracético é um ácido mais forte, tornando o pH da fase móvel mais ácido com a adição de uma menor quantidade quando comparado com o ácido acético. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA *et al.*, 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos seis marcadores.

8.4.2 Espectro de UV para os marcadores

A varredura espectral de 200 a 800 nm permite a visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e melhor resposta de sinal cromatográfico. Considerando o espectro UV dos padrões obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos (Figura 127), o cromatograma dos padrões foi obtido em 265 nm.

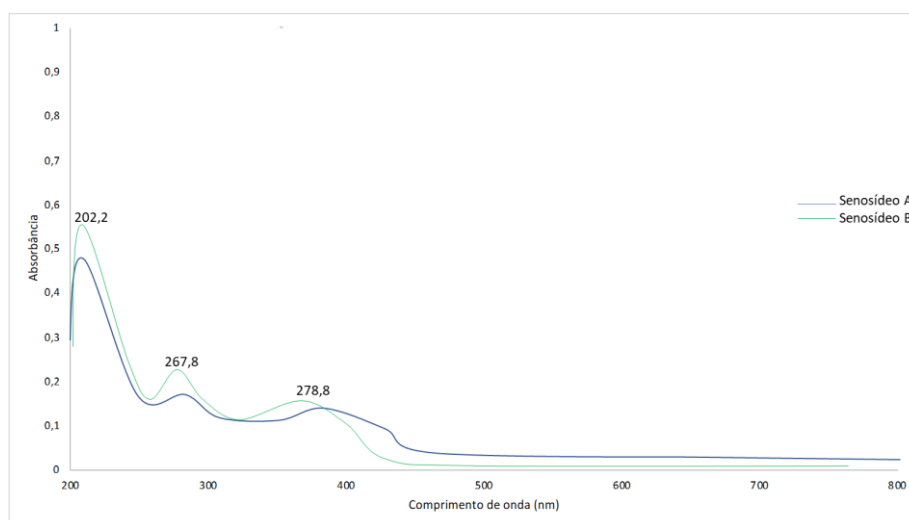


Figura 127: Espectros ultravioleta das amostras *C. angustifolia* com adição de padrão interno na região de 200 a 800 nm

A partir da análise da Figura 127, nota-se que os senosídeos absorvem nos comprimento de onda: 202,2 (banda I), 267,8 (banda II) e 378,8 (banda III) nm.

8.4.3 Validação do método analítico desenvolvido

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI, *et al.*, 2004).

Para tanto, uma adequação do delineamento analítico para conduzir os ensaios de validação deve ser realizado, levando-se em consideração as limitações existentes na metodologia, no que diz respeito ao longo tempo de corrida cromatográfica.

O estudo de validação para metodologia otimizada para CLAE foi conduzido avaliando-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e Precisão intermediária) e exatidão, além dos parâmetros para avaliação de desempenho de sistema. A escolha dos níveis de concentração avaliados no parâmetro linearidade foi baseada nos limites de especificação estabelecidos na análise de teor e de uniformidade de conteúdo apresentado na USP 34ª edição (USP, 2011).

8.4.3.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O diluente utilizado no preparo das amostras foi injetado nas mesmas condições para verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes, o que foi confirmado como se observa na Figura 128. O pico que é registrado foi eluído antes dos marcadores utilizados nesse trabalho.

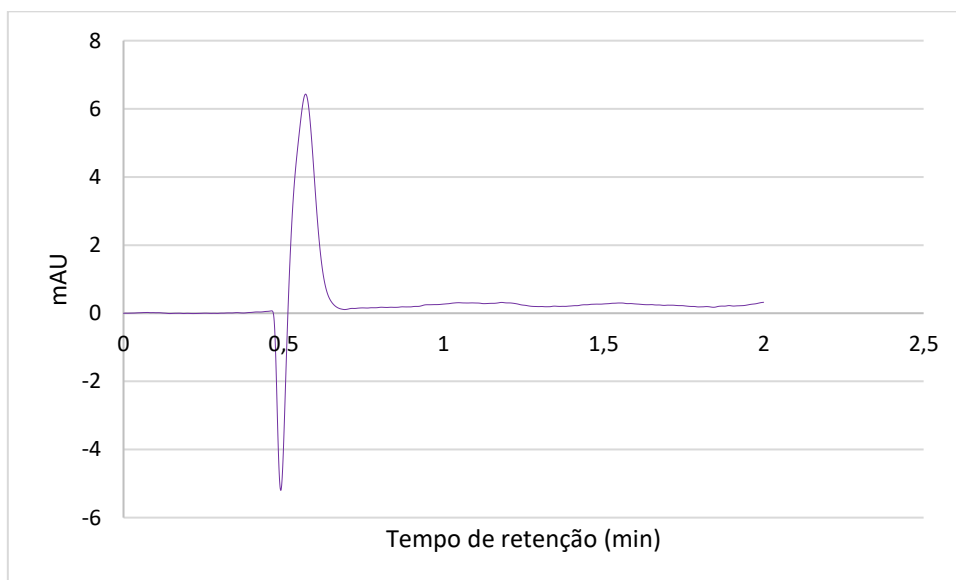


Figura 128: Análise cromatográfica do diluente (metanol) dos marcadores e amostra de *C. angustifolia*.

A pureza do pico também é aceita como uma das condições de avaliação do parâmetro de seletividade, sendo determinada pelo detector DAD (Figura 129).

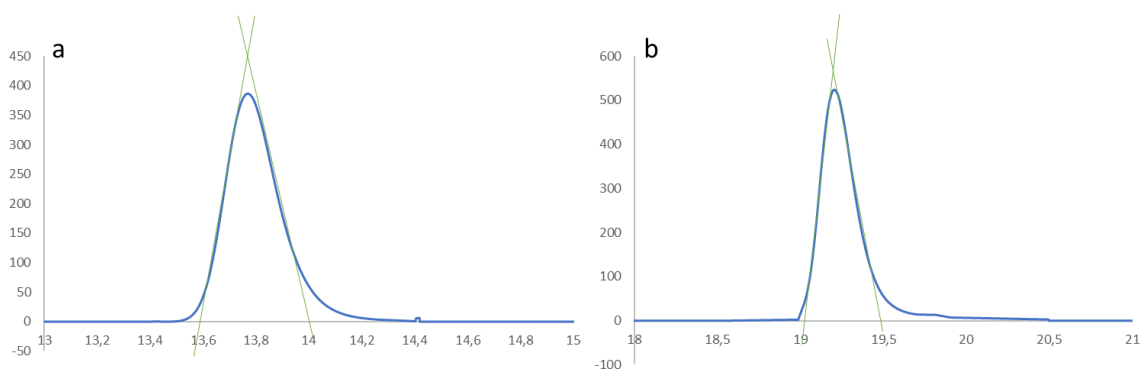


Figura 129: Análise da pureza dos padrões de *C. angustifolia*: senosídeo A (a) e senosídeo B (b). A área entre as barras verdes corresponde a área pura.

Pela análise espectral, acredita-se que a pureza foi comprovada, pois nota-se que a maior parte dos picos estão entre as tangentes das retas, o que confere confiabilidade de 95% nas análises. Dessa forma, de acordo com os critérios descritos na legislação brasileira vigente, a metodologia é considerada específica (BRASIL, 2003).

8.4.3.2 Adição dos marcadores

A adição de marcadores na amostra de *C. angustifolia* foi realizada para corroborar a presença dos picos e o tempo de eluição de cada marcador. A Figura 130 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *C. angustifolia* e a análise dos marcadores comparado ao cromatograma de *C. angustifolia*.

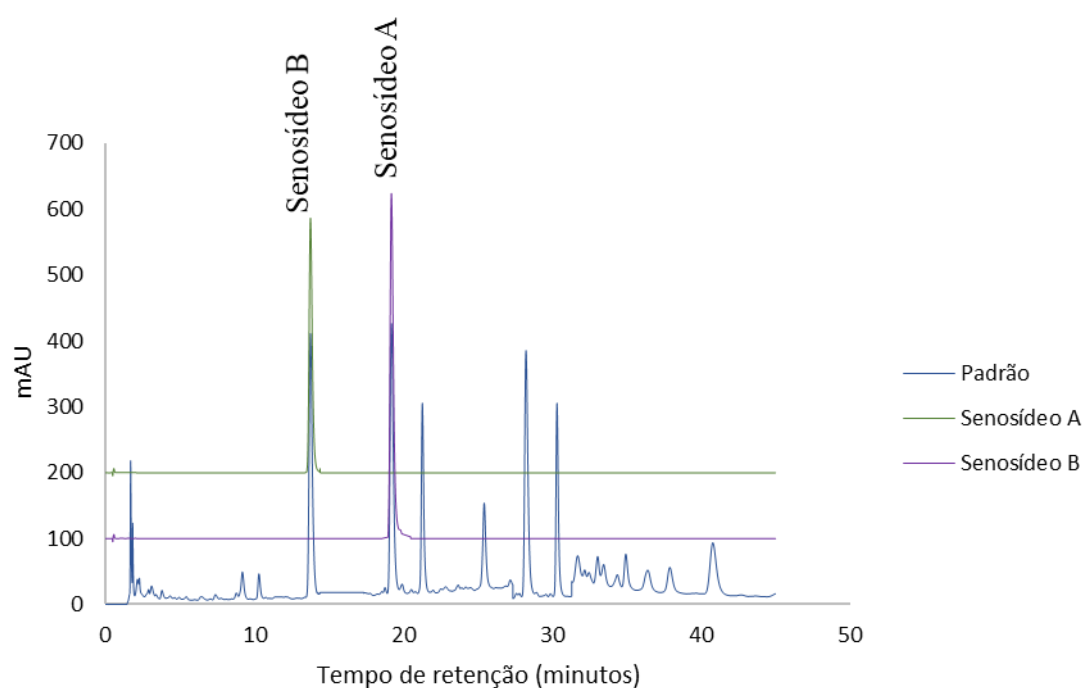


Figura 130: Cromatograma de *C. angustifolia* juntamente com a adição dos marcadores químicos padrões: Amostra padrão – identificada (azul), senosídeo A (verde), Senosídeo B (lilás).

8.4.3.3 Robustez

Para avaliar a robustez da metodologia, o parâmetro fluxo da fase móvel foi alterado para observar se o método resiste a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A robustez do método foi avaliada a partir da verificação da concentração determinada em relação ao padrão (100 µg/mL) e alterando-se o fluxo da fase móvel (Quadro 10).

Quadro 10: Avaliação da robustez através da modificação no fluxo da fase móvel para os padrões de *C. angustifolia*.

Marcador	Condições Alteradas	Concentração (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	DP	DPR (%)
Senosídeo A	Método original	100,07	100,50	0,70	0,69
		101,30			
		100,12			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,06	100,11	0,22	0,22
		99,92			
		100,35			
	Fluxo (0,8mL/min)	105,01	105,85	0,73	0,69
		106,32			
		106,22			
Senosídeo B	Método original	101,05	99,93	1,15	1,15
		98,76			
		99,99			
	Fluxo (1,2 mL/min)	108,05	104,21	4,02	3,85
		104,55			
		100,04			
	Fluxo (0,8mL/min)	105,24	107,88	2,54	2,36
		100,31			
		100,09			

Os resultados obtidos no quadro acima cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas. De fato, o desvio padrão relativo (DPR) foi baixo. Dessa forma, os dados estão dentro de um índice de confiabilidade de 95%.

8.4.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Com o software *Chromeleon* foi possível medir o ruído (μ_{Abs}) e o sinal (μ_{Abs}) proporcionado pelo detector ao passar um analito. O ruído foi obtido através de uma amostra em branco, enquanto o sinal através de uma solução padrão contendo todos os compostos numa concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas amostras foram injetadas em triplicada no sistema cromatográfico, nas condições estabelecidas, obtendo uma média dos ruídos e dos sinais, relativo a concentração dos analitos. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados da seguinte forma:

$$LD = C \times \frac{3}{S_m/R_m} \qquad LQ = C \times \frac{10}{S_m/R_m}$$

Onde:

C = concentração do composto ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

S_m = média dos sinais obtidos (μ_{Abs}) ($n = 3$)

R_m = média do ruído (μ_{Abs}) ($n = 3$)

3 = a razão S/R mínima para um pico ser detectado com segurança

10 = a razão S/R mínima para um pico ser quantificado com segurança (SNYDER, 1997)

A Tabela 73 apresenta os valores estimados de LD e LQ da técnica para os compostos analisados nas condições de separação e quantificação estabelecidas. Os valores de LD e LQ estão de acordo com a sensibilidade de cada composto como pôde ser observado através das curvas analíticas.

Tabela 73: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *C. angustifolia*.

Padrão	S_m/R_m	LD	LQ
Senosídeo A	124,13	0,002	0,008
Senosídeo B	64,37	0,004	0,015

Os LD variaram entre $0,002$ e $0,004 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor de LD mais baixo foi obtido para o senosídeo A ($0,002 \mu\text{g mL}^{-1}$). O valor de LQ mais altos foi obtido para Senosídeo B, com valor igual a $0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vale ressaltar, que os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

8.4.3.5 Precisão

A precisão reflete o grau de dispersão dos resultados quando o método é aplicado em várias amostras, desde que seja realizado em um mesmo laboratório com a mesma metodologia de preparo da amostra e fazendo-se uso dos mesmos equipamentos. A precisão é dividida em três categorias (ANVISA, 2003; ICH, 1996): repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão intercorrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

Uma das maneiras de se realizar a determinação da precisão é pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) de seis replicatas. Para a precisão intermediária, geralmente consideram-se medidas nas quais se avalia a influência de variação de equipamento utilizado, analista e/ou dia de análise. Por outro lado, a reprodutibilidade é um parâmetro mais comumente associado com variações entre laboratórios (ICH, 1996).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), não sendo admitidos valores superiores a 15% (BRASIL, 2002; ICH, 2005).

8.4.3.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução padrão ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), executada por um mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período, conforme apresentado na Tabela 57.

Tabela 74: Dados de repetibilidade para os marcadores de *C. angustifolia* na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Repetição	Senosídeo A	Senosídeo B
1	1,0560	1,0397
2	1,0595	1,0440
3	1,0475	1,0360
4	1,0565	1,0487
5	1,0380	1,0347
6	1,0480	1,0360
Média	1,0509	1,0398
DP	0,0080	0,0055
DPR (%)	0,7585	0,5294

A partir dos valores de coeficiente de variação (CV) obtidos na análise de repetibilidade, pode-se assegurar que não há variabilidade significativa nos resultados durante o decorrer da rotina de um dia de análise. De fato, estes resultados apresentaram-se relativamente próximos, com variações inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

8.4.3.5.2 Precisão intermediária

A precisão verificada para os padrões de *C. angustifolia* no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas Tabelas 75 e 76, respectivamente.

Tabela 75: Precisão intra-dia do método para quantificação dos marcadores de *C. angustifolia* por HPLC, na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Repetição	Senosídeo A		Senosídeo B	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
1	1,0560	1,1020	1,0397	1,102
2	1,0595	1,0980	1,0440	1,098
3	1,0475	1,0870	1,0360	1,087
4	1,0565	1,1150	1,0487	1,115
5	1,0380	1,0800	1,0347	1,080
6	1,0480	1,0890	1,0360	1,089
Média	1,0509	1,0952	1,0398	1,095
DP	0,0080	0,0125	0,0055	0,012
DPR (%)	0,7585	1,1425	0,5294	1,14

DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo

Tabela 76 Precisão inter-dia método para quantificação dos marcadores de *C. angustifolia* por HPLC, na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Repetição	Senosídeo A		Senosídeo B	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	1,0560	1,0323	1,0397	1,0693
2	1,0595	1,0383	1,0440	1,0670
3	1,0475	1,0290	1,0360	1,0640
4	1,0565	1,0360	1,0487	1,0993
5	1,0380	1,0250	1,0347	1,0733
6	1,0480	1,0287	1,0360	1,0650
Média	1,0509	1,0316	1,0399	1,0730
DP	0,0080	0,0050	0,0055	0,0133
DPR (%)	0,7585	0,4831	0,5298	1,2420

Na análise de matrizes complexas, como extrato de plantas, é sabido que a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2 e 20 % (ROZET *et al.*, 2007). Por outro lado, para a validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a decisão deva apresentar desvio padrão relativo (DPR) menos que 20 % (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007). Dessa forma, todos os resultados obtidos estão dentro do limite sugerido.

8.4.3.5.3 Exatidão

A exatidão do método é expressa em termos de percentagem de recuperação e definida como a quantidade de substância de interesse presente ou adicionada na amostra, passível de extração e quantificação. A exatidão pode ser avaliada referente a adição de substância padrão de referência ou do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004; ERMER e MILLER, 2005).

Dessa forma, a partir do método da adição de padrão, onde se adicionou quantidades conhecidas das amostras às soluções, o percentual de recuperação dos métodos desenvolvidos foi calculado por meio da concentração média encontrada nas análises, aplicando as áreas dos picos de cada condição na equação da reta. Os resultados estão dispostos na Tabela 77.

Tabela 77: Recuperação das soluções padrão dos marcadores de *C. angustifolia* adicionadas às amostras e analisadas pelo método proposto (n=3)

Composto	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Adicionada	Encontrada	DPR (%)	% Recuperação
Senosídeo A	0,0500	0,0483	3,40	96,6
	1,0000	1,0050	0,50	100,5
	5,0000	4,9513	0,97	99,03
Senosídeo B	0,0500	0,0512	2,40	102,4
	1,0000	0,9975	0,25	99,75
	5,0000	5,0367	0,73	100,73

O percentual de recuperação encontrado nas análises apresentou valores compreendidos entre 96,6% e 102,4%. Tais valores comprovam a exatidão da

metodologia, uma vez que apresentam níveis aceitáveis de recuperação com erro relativo de, no máximo, 3,4%.

8.4.3.5.4 Linearidade e intervalo de confiança

A linearidade de um método analítico consiste em obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2003). Na prática, a linearidade é determinada por estudos de gráfico de calibração, seguidos de tratamento estatístico (CASS e DEGANI, 2001). Tais métodos são úteis para a determinação do coeficiente de correlação (r^2), intersecção com o eixo x, coeficiente angular e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

Para a determinação da linearidade, o ensaio é realizado utilizando-se no mínimo cinco concentrações conhecidas do padrão (em triplicata) e, essas concentrações devem abranger o intervalo especificado pelo método, contemplando o limite de variação esperado (80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta que se pretende analisar (ANVISA, 2003).

A linearidade é considerada, erroneamente, como apenas um ajuste adequado, fornecido pelo coeficiente de correlação, como ferramenta para avaliação da linearidade no intervalo de concentrações estudado. A revisão de Burke demonstra que apenas um alto valor de r não significa, necessariamente, que a distribuição dos resultados é linear (BURKE, 2001; CROWTHER, 2001; LISTER, 2005). Adicionalmente, um dos métodos mais aceitos para a rápida avaliação da distribuição linear dos resultados é o cálculo e construção do gráfico de resíduos (BURKE, 2001).

As curvas analíticas obtidas indicaram correlação adequada entre a concentração de Senosídeo A e Senosídeos B e as áreas dos picos, numa faixa compreendida entre 0,1-50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados referentes às triplicatas das curvas padrão estão dispostos nas Tabelas 78 e 79 para senosídeo A e senosídeo B, respectivamente..

Tabela 78: Valores referentes à triplicata da curva padrão de senosídeos A.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0,1	256984	251844,32	256881,2064	255237	2938,17	1,15116
0,5	558795	548458,1	558571,482	555275	5904,55	1,06336
1	964233	951203	930227,06	948554	17157	1,80875
2,5	1894855	1858997,9	1894097,058	1882650	20486,8	1,08819
5	2553153	2514950	2565249	2544451	26254,4	1,03183
10	3787098	3711356,04	3585583,161	3694679	101787	2,75497
25	8237667	8072913,66	8334371,933	8214984	132197	1,60922
50	16084851	15753153,98	16078417,06	1,6E+07	189675	1,18754

Tabela 79: Valores referentes à triplicata da curva padrão de senosídeos B.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	CV (%)
0,1	276525	222490,32	249174,77	249396,7	27018	10,8334
0,5	571336	527104,1	541814,34	546751,48	22525,5	4,11987
1	976774	929849	902320,25	936314,42	37645,6	4,02062
2,5	1907396	1837643,9	1837274,1	1860771,3	40378,6	2,16999
5	2565694	2493596	2488291,5	2515860,5	43238,5	1,71864
10	3799639	3690002	3478015,7	3655885,6	163503	4,47233
25	8250208	8051559,7	8084340,8	8128702,8	106495	1,31012
50	16097392	15731800	15596065	15808419	259297	1,64025

A curva de calibração e os dados obtidos a partir dela estão mostrados na Figura 131 e Tabela 80, respectivamente.

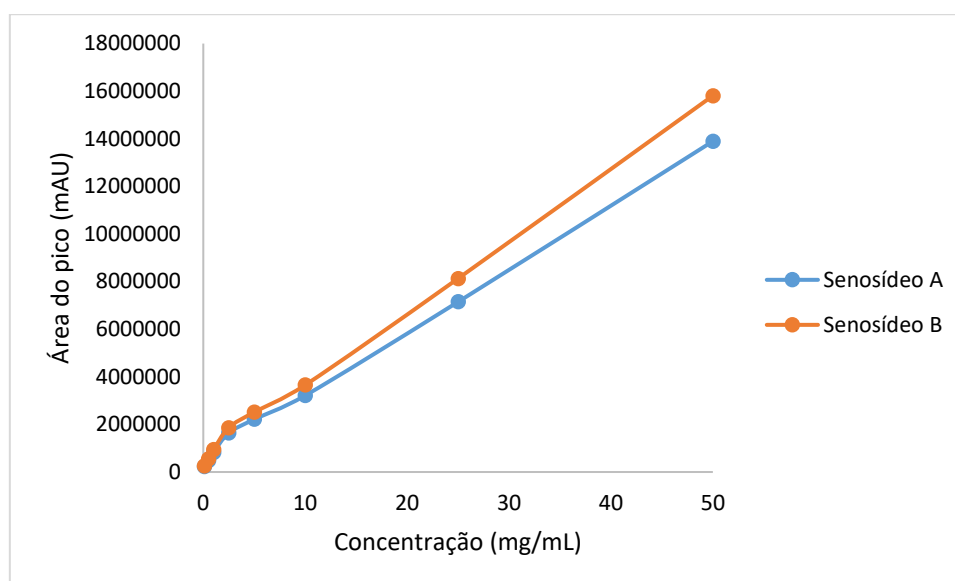


Figura 131: Curva analítica determinada por CLAE dos compostos Senosídeo A e Senosídeo B.

Tabela 80: Valores obtidos das curvas analíticas para análise de senosídeos A e senosídeos B em amostras de *C. angustifolia* por HPLC.

Parâmetros da curva analítica	Senosídeo A	Senosídeo B
Coefficiente de correlação (r)	0,997	0,998
Equação da reta (y=ax+b)	$y = 266537x + 569754$	$Y = 306364x + 654889$
Desvio padrão da regressão	0,063	0,024
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	0,1-50	0,1-50
Número de pontos	8	8

O coeficiente de correlação fornece informações sobre a qualidade da curva obtida, indicando menos dispersão dos conjuntos de pontos experimentais e menos incerteza nos parâmetros da regressão linear, quanto mais próximo o valor for de 1,0. Um coeficiente de correlação maior do que 0,99 é considerado um ajuste ideal de dados. Assim, as curvas analíticas para a determinação dos compostos em questão apresentam ajuste ideal de resultados, inferindo menor erro nas análises.

Ademais, o intervalo estudado mostrou-se linear sob a investigação do gráfico de resíduos (Figura 132). Além disso, o teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear realizado pelo Excel. A análise de dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, da mesma forma que

não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F crítico no nível de significância de 95%. Portanto, o método analítico desenvolvido possui linearidade entre 0,1 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

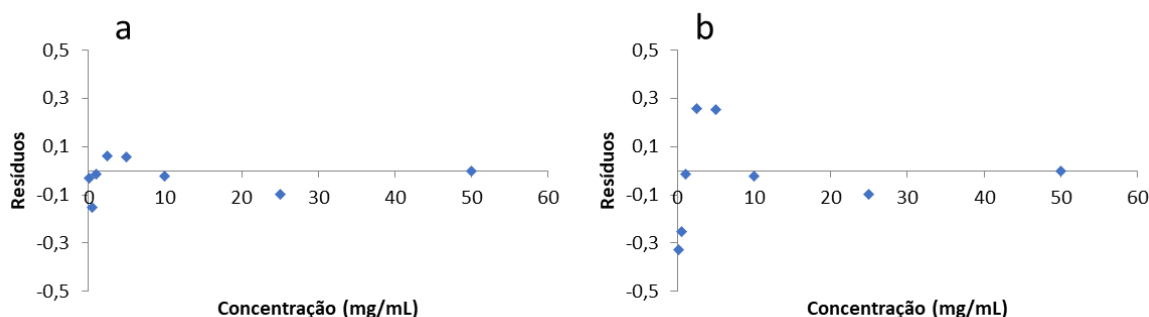


Figura 132: Gráfico de resíduos da linearidade de Senosídeo A (a) e Senosídeo B (b)

8.4.4 Aplicação da metodologia proposta.

A construção de impressões digitais cromatográficas (*fingerprint*) visa avaliar a qualidade da planta medicinal ou fitoterápico. A razão fundamental do controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos é baseada no conceito de fitoequivalência das amostras, e depois usar essa concepção para identificar se o medicamento fitoterápico é falso ou verdadeiro (controle de qualidade), bem como quantificar os princípios ativos e marcadores. Assim, o método intuitivo de avaliação é comparar as semelhanças e / ou diferenças da forma das impressões digitais cromatográficas. Como resultado, tanto os graus de separação quanto a distribuição de concentração dos componentes envolvidos em uma impressão digital cromatográfica também são levados em consideração para esta avaliação. Pensando nesse contexto, a Figura 133 apresenta os resultados obtidos para as análises de *C. angustifolia* comercializados em feiras livres do estado da Bahia.

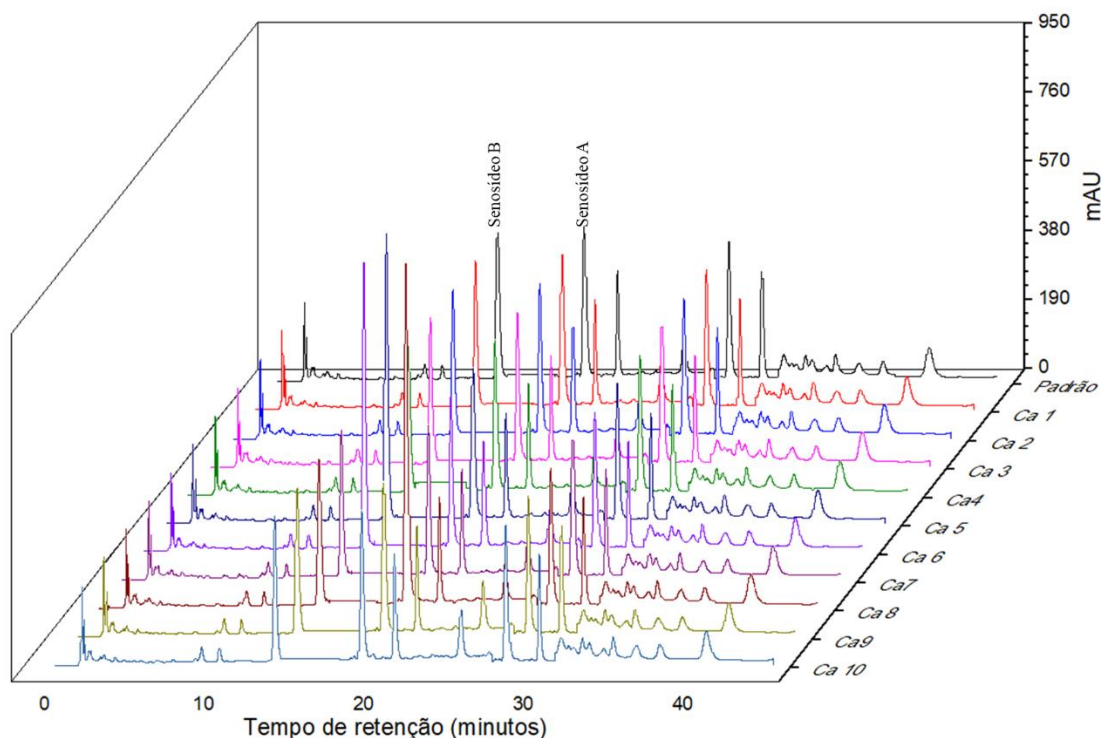


Figura 133: Cromatograma das amostras de *C. angustifolia* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

A partir da análise da Figura 135, observa-se que há alta correlação entre os cromatogramas analisados. A análise visual revela que os cromatogramas apresentam-se conservados. Todavia, é perceptível que as amostras Ca 4, Ca 5 e Ca 6 apresentam área maior do que a amostra padrão para a presença do composto Senosídeo B e as amostras Ca 6, Ca 7 e Ca 8 para Senosídeo A.

Existem diversos relatos na literatura avaliando a concentração de metabólitos secundários. Tais pesquisas, revelam que variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH *et al.*, 1987; DARROW e BOWERS, 1997; WATERMAN e MOLE, 19889). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente

circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Os cromatogramas obtidos na Figura 133 foram utilizados para a determinação da concentração dos marcadores químicos utilizados (Tabela 81). As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas antes de 28 dias, prazo recomendado (STANDARD METHODS, 1997).

Tabela 81 Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *C. angustifolia* coletadas no estado da Bahia. Rp (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso, e das amostras de fitoterápicos analisados.

Concentração dos padrões (mg/g) ± desvio padrão		
Amostra	Senosídeo A	Senosídeo B
Padrão	33,0375 ± 0,042	36,1281 ± 0,505
Ca 1	33,7374 ± 0,017	36,6531 ± 0,489
Ca 2	32,5095 ± 0,057	35,7321 ± 0,512
Ca 3	32,7105 ± 0,073	35,8829 ± 0,530
Ca 4	34,8952 ± 0,063	54,7714 ± 0,551
Ca 5	34,3515 ± 0,427	42,0808 ± 0,907
Ca 6	45,1839 ± 0,631	45,4480 ± 1,264
Ca 7	51,2280 ± 0,519	35,2641 ± 1,236
Ca 8	49,5728 ± 0,276	32,8058 ± 0,970
Ca 9	34,2777 ± 0,063	36,3083 ± 0,543
Ca 10	34,6377 ± 0,139	36,2033 ± 0,623
Aca	33,0759 ± 0,258	36,1569 ± 0,721
Bca	33,6993 ± 0,258	36,6245 ± 0,729
Cca	31,3725 ± 0,084	34,8794 ± 0,523

Ca = *Cassia angustifolia*

Observa-se que a concentração dos metabólitos se mostrou praticamente sem diferenças significativas entre as amostras analisadas, todavia, algumas amostras

apresentaram concentração mais elevada comparada a amostra padrão. As amostras dos fitoterápicos analisadas, mostram-se correlatas com o padrão.

Dhanani *et al.* (2017) avaliaram o feito dos processos de extração dos compostos presentes em *C. angustifolia* e concluíram que há diferenças significativas na quantidade dos compostos antraquinônicos presentes em amostras comerciais de sene. A variação pode ser atribuída a fatores como fonte geográfica, métodos de cultivo e processamento (SANGWAN *et al.*, 2004).

De acordo com a farmacopeia brasileira de 2016 (ANVISA, 2016) o extrato seco do folíolo de sene deve conter de 5,5% até 8% de glicosídeos hidroxiantracênicos, calculados como senosídeo B. Tal determinação é corroborada pela European Pharmacopeia (2016) e European Medicines Agency (2006).

A Tabela 82 apresenta a variação em percentagem das análises comparadas ao declarado pelo fornecedor.

Tabela 82: Comparação percentual dos teores* de senosídeos utilizados em amostras comerciais de *C. angustifolia*.

Amostra	Valor declarado (%)	Valor encontrado (%)	Variação (%)
A_{Ca}	10	12,06	20,60
B_{Ca}	35	36,23	3,54
C_{Ca}	2,5	2,70	8,00

*Os teores referem-se a padronização por Senosídeo B

A análise da Tabela 82 revela que há variações em relação a quantidade de senosídeos nas amostras analisadas. As diferenças encontradas para os produtos comerciais variaram entre 3,54% (produto B_{Ca}) e 20,60% (produto A_{Ca}) em relação aos metabólitos presentes. Dessa forma, verifica-se que há necessidade de controle de qualidade rigoroso nas amostras comerciais.

8.4.5 Espectrofotometria UV-VIS

A Figura 134 apresenta o espectro na região ultravioleta-visível dos padrões.

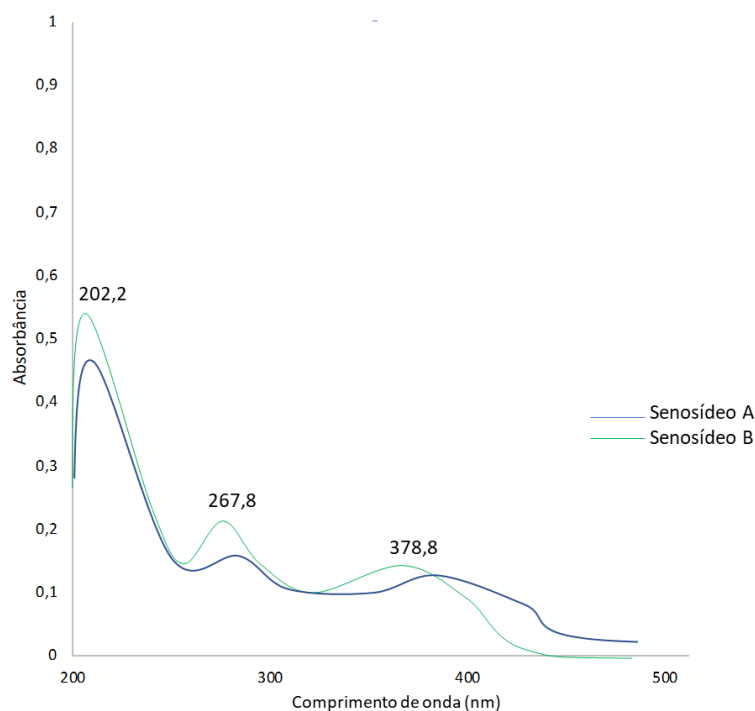


Figura 134 Espectros ultravioleta dos marcadores Senosídeos A e B de *C. angustifolia* na região de 200 a 500 nm.

A análise da Figura 134 revela que a determinação de senosídeos A e B separadamente por UV-Vis, torna-se inviável diretamente, uma vez que ambos marcadores absorvem nos mesmos comprimentos de onda. Dessa forma, o método espectrofotométrico para a determinação dos compostos senosídicos, baseou-se na reação colorimétrica de Borntträger, onde as agliconas e as antraquinonas glicosiladas comportam-se de diferentes maneiras. Apenas os compostos que não possuem açúcar são detectadas por este reagente, sendo necessária uma hidrólise preliminar dos heterosídeos antraquinônicos para um doseamento eficiente buscando a finalidade pretendida, principalmente pelo fato de polifenóis existirem predominantemente como glicosídeos na natureza (CHIANG *et al.*, 2012).

Nesta reação, as substâncias 1,8-hidroxiantraquinônicas exercem efeito mesomérico acentuado, em virtude dos grupos carbonilas. Este estado de mesomeria é alcançado pela formação de uma ponte de hidrogênio, resultando em um sistema de quatro anéis. Em solução, as moléculas absorvem luz em aproximadamente 430nm, possuindo uma cor amarelo-alaranjada. Para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos na reação de Borntträger é necessário que o meio esteja alcalino para que ocorra a ionização das hidroxilas fenólicas. Esta ionização produz uma maior

ressonância molecular, fazendo com que os máximos de absorção desloquem-se nos sentidos de maiores comprimentos de ondas (cerca de 520 nm) (Figura 135) e as soluções alcalinas coram-se de vermelho, cor característica observada na reação de Bornträger (COSTA, 1994; SOUSA *et al.*, 2003).

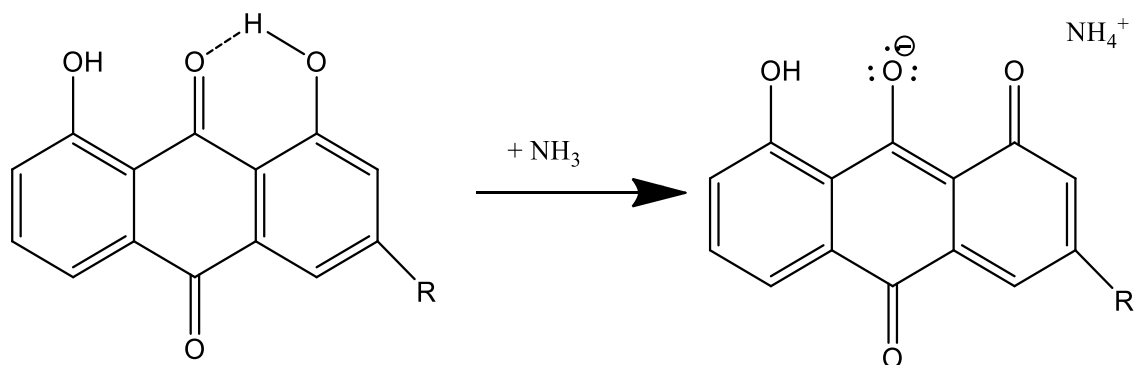


Figura 135: Deslocamento do comprimento de onda em virtude da ionização das hidroxilas das antraquinonas na reação de Bornträger.

Dentre os métodos utilizados para o doseamento dos derivados hidroxiantracênicos por espectrofotometria, está o método farmacopeico. No entanto, tal metodologia requer um grande tempo de preparação, estando classificada como um método analítico bastante demorado, pois a preparação da amostra consiste em diversas etapas e na utilização de solventes tóxicos e reagentes e equipamentos que podem ser de difícil obtenção em alguns laboratórios de análise. O desenvolvimento de metodologias menos onerosas, mais facilmente executáveis e que normalmente empregam menor aparato instrumental são de grande valia e requerem a realização de estudos de validação destas técnicas para cada espécie e órgão vegetal específico a fim de garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (PELOZO *et al.*, 2008; SILVA-CORAZZA *et al.*, 2010). Nesse sentido, a fim de desenvolver um novo método para a determinação do teor de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *C. angustifolia* e do seu controle de qualidade, um método de doseamento através da Espectrofotometria na região do Visível foi desenvolvido e validado, daí a importância do desenvolvimento de uma técnica analítica rápida e simples para quantificar o ingrediente ativo, com a intenção de contribuir para o desenvolvimento de novas drogas

A Figura 136 apresenta o espectro UV-vis dos padrões de *C. angustifolia* antes e depois da reação de Bornträger.

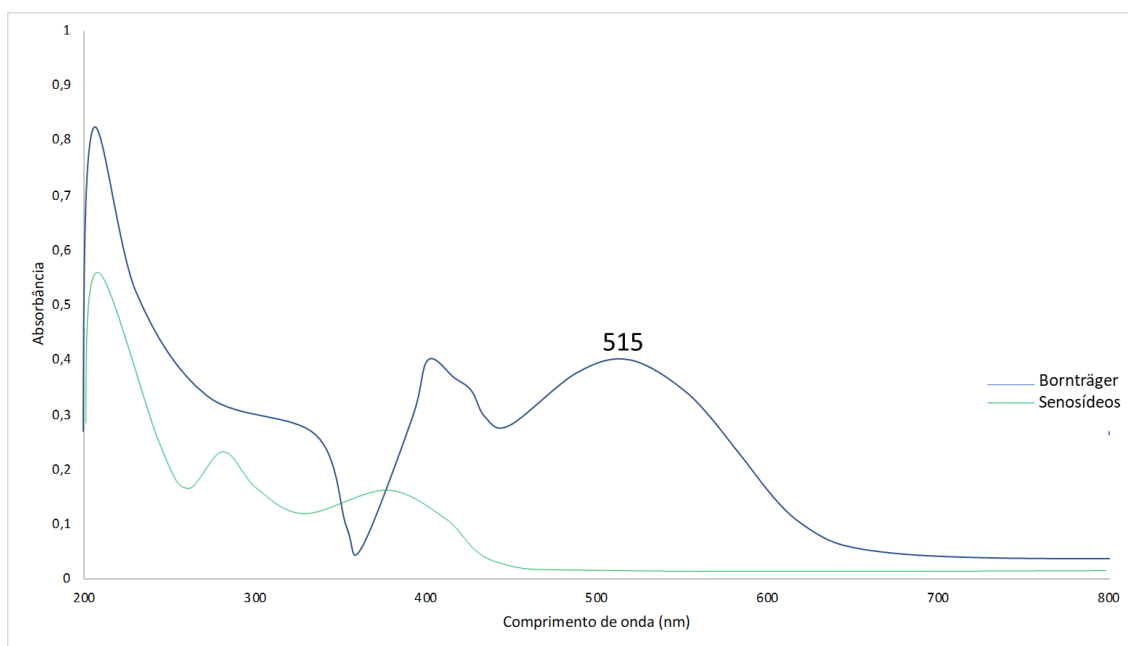


Figura 136: Espectro de varredura da amostra de *C. angustifolia* na faixa de 200 e 800 nm.

O comprimento de onda observado no espectro de absorção da amostra (Figura 138), após a reação com NH_4OH , apresentou máximo em 515 nm.

Para a quantificação de senosídeos pela metodologia UV-vis, utilizou-se a adição de soluções de concentrações conhecidas. Dessa forma, a Figura 137 apresenta a curva analítica obtida por UV-Vis.

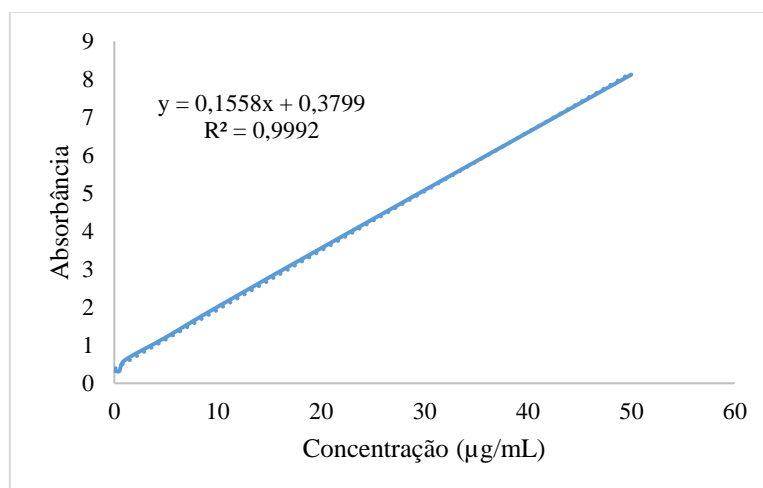


Figura 137: Curva analítica para determinação de senosídeos A e B em amostras de *C. angustifolia* por Uv-vis.

A curva analítica para a determinação de senosídeos por UV-Vis foi obtida através da regressão linear de mínimos quadrados e apresenta os seguintes parâmetros: $y = 0,1558x + 0,3799$, com correlação igual a $R^2 = 0,9992$. Tais dados refletem elevada linearidade da análise. Comprovando, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respostas espectrométricas, atendendo os requisitos preconizados para análise desse parâmetro (> 99%) (BRASIL, 2003).

A partir da curva analítica, foi determinada a concentração de senosídeos A e B, conjuntamente, presentes nas amostras analisadas (Tabela 83).

Tabela 83: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *C. angustifolia* coletadas no estado da Bahia. Ca (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso e nas amostras de fitoterápicos.

Concentração dos padrões (mg/g) ± desvio padrão			
Amostra	Senosídeo A e B		
Padrão	71,7873	±	0,0715
Ca 1	73,0436	±	0,0646
Ca 2	70,8395	±	0,0754
Ca 3	71,2003	±	0,0808
Ca 4	94,0968	±	0,0814
Ca 5	79,6098	±	0,1987
Ca 6	93,8211	±	0,2841
Ca 7	88,481	±	0,2582
Ca 8	84,1719	±	0,1765
Ca 9	73,1884	±	0,0805
Ca 10	73,4221	±	0,1056
Aca	71,8562	±	0,1416
Bca	72,9752	±	0,1427
Cca	68,7986	±	0,0822

A análise da Tabela 83 demonstra que a metodologia é de grande valia para a quantificação dos senosídeos A e B nas amostras estudadas, estando de acordo ao esperado. Ademais, as amostras apresentam elevada correlação em relação a concentração dos marcadores quando comparado a metodologia por HPLC-DAD.

8.4.6 Análises estatísticas

Durante o desenvolvimento de uma metodologia, a validação da mesma se dá por comparação à outra metodologia. Dessa forma, a comparação entre os métodos, HPLC e UV-Vis, foi avaliada quanto a correlação (ANOVA) entre os dois métodos, teste t, HCA e PCA. Além disso, foi utilizado a análise por HCA e PCA para avaliação e comparação das amostras comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

8.4.6.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A análise de similaridade (HCA) é um modelo confiável para avaliar a impressão digital cromatográfica (*fingerprint*) de várias fontes com base no cálculo dos coeficientes correlativos dos dados originais. Os coeficientes de correlação de similaridade entre os perfis cromatográficos foram calculados pelo uso do software profissional de análise de cromatograma. Os resultados do HCA são mostrados na Figura 138.

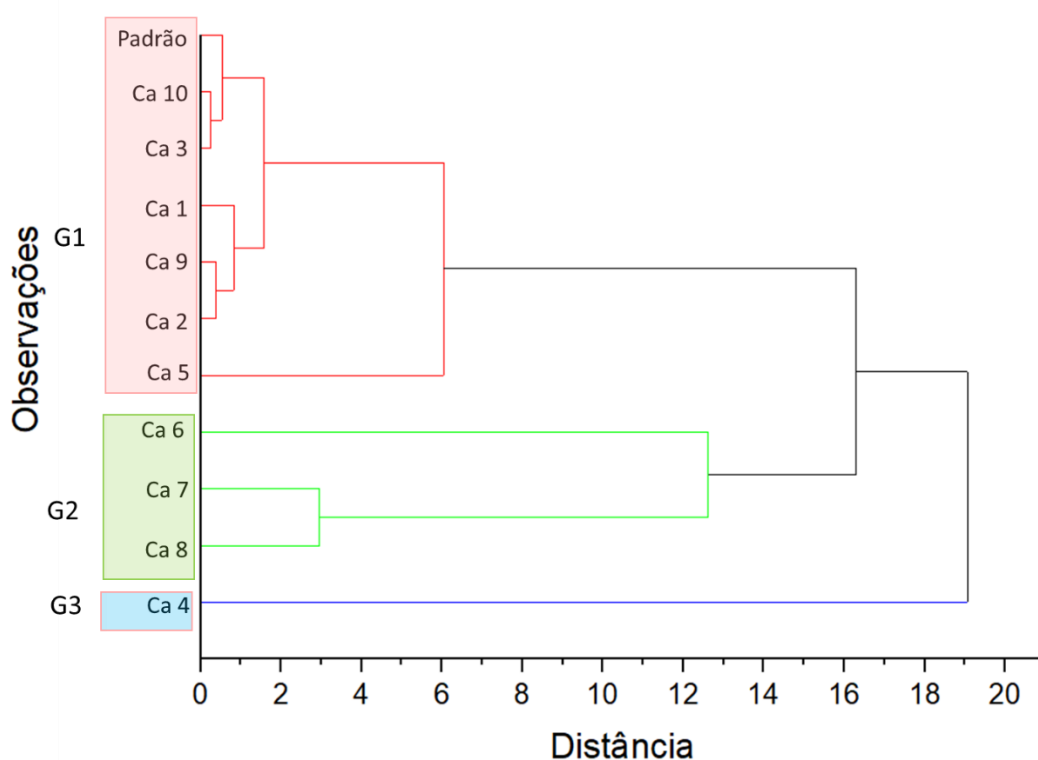


Figura 138: Dendrograma de duas composições químicas para 11 amostras de *C. angustifolia*. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3.

No dendrograma HCA, a menor distância entre duas amostras indicou sua maior similaridade e as amostras agrupadas no mesmo grupo foram as mais similares. O grupo 1 composto pelas amostras: padrão, Ca 10, Ca 3, Ca 1, Ca 9 e Ca 2, com maior similaridade foram classificados em um aglomerado, da mesma forma que o grupo G2, composto por Ca 6, Ca 7 e Ca 8. As outras amostras, Ca 4 e Ca 5, formaram grupos a parte: grupo 3. Dessa forma, podemos inferir que os resultados de agrupamento poderiam ser causados pelas diferenças de origem vegetal, efeito do ambiente, estação de coleta, condições de armazenamento, etc. das amostras.

8.4.6.2 Análise de dos componentes principais (PCA)

Para avaliar o teor dos elementos em estudo, a distribuição dos mesmos nas matrizes analisadas, dentre outros aspectos, realizou-se a análise de componentes principais utilizando o programa Origin.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 84, observa-se que somente uma componente principal formada (PC1 56,33 %) apresenta autovalor igual ou superior a 1. Essa componente juntas permite explicar 56,33 % da variância total dos resultados, sendo então utilizada para análise das amostra em questão.

Tabela 84: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	1,1265	56.33%	56.33%
2	0,8735	43.67%	100.00%

A Tabela 85 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

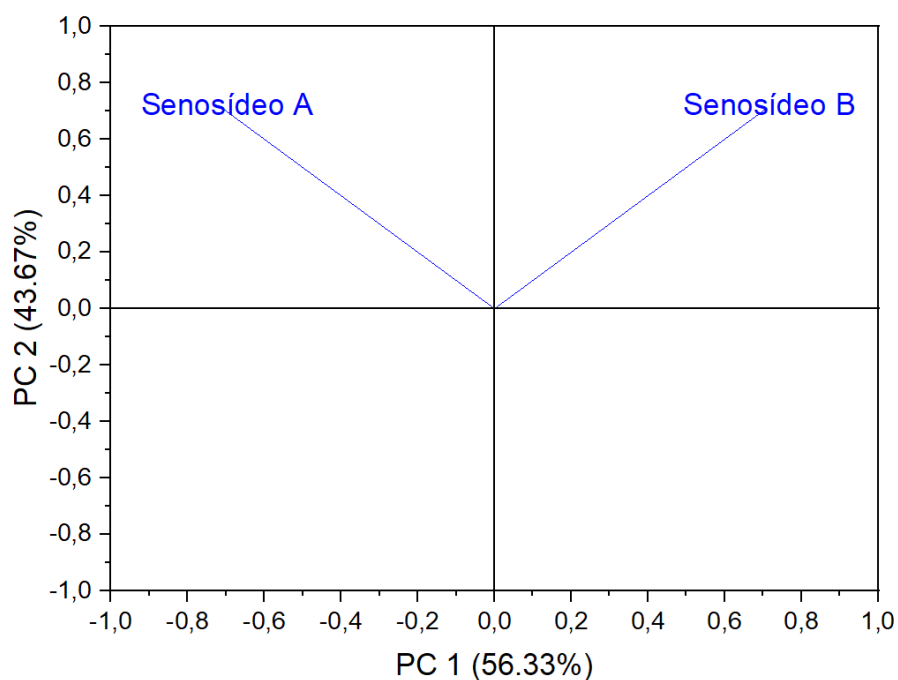
Tabela 85: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2
Senosídeo A	-0,70711	0,70711
Senosídeo B	0,70711	0,70711

A partir dos valores da Tabela 85, observa-se que ambos os marcadores tem pesos na avaliação dos agrupamentos, uma vez que apresentam os mesmos valores de correção. Tal fator já era esperado, uma vez que somente dois componentes estão presentes nas análises.

8.4.6.2.1 Análise de PC1 x PC2

Obteve-se os gráficos de pesos (Figura 139) e escores (Figura 140) para a análise de PC1 x PC2. A partir da análise da Figura 139, observa-se que a PC1 é responsável pela separação dos compostos, uma vez que os marcadores apresentam maiores contribuições com valor negativo e positivos. Por outro lado, a PC2, os marcadores apresentam a mesma importancia na contribuição com valores positivos.

**Figura 139:** Gráfico de pesos PC1 x PC2.

Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, nota-se a formação de cinco grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda acima, composto pelas amostras Ca7 e Ca 8, um segundo grupo central acima formado por Ca 6 um terceiro grupo à direita acima composto por Ca 4, um grupo central deslocado a direita (Ca 5) e um grupo central abaixo composto pelas amostras padrão, Ca1, Ca 2, Ca 3, Ca 9 e Ca 10.

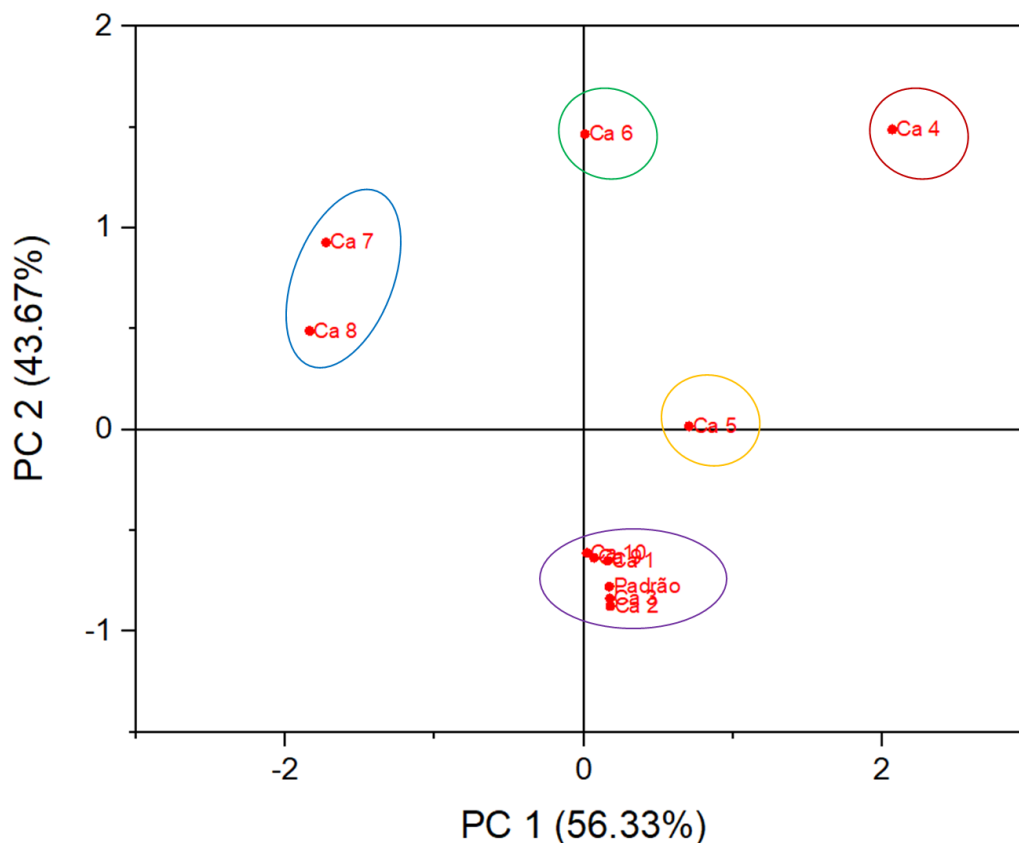


Figura 140: Gráfico de escores PC1 x PC2.

Os resultados obtidos na Figura 140 permite avaliar a condição e a qualidade das drogas vegetais analisadas. De fato, as amostras Ca1, Ca 2, Ca 3, Ca 9 e Ca 10 são mais semelhantes em quantidade de metabólitos com a amostra padrão do que as outras amostras. Essa correlação indica que a quantidade de metabólitos e, conseqüentemente, princípio ativo, afetam diretamente a produção de medicamentos. Além disso, a análise por PCA permite avaliar a qualidade das drogas vegetais comercializadas no estado da Bahia. Apesar das outras amostras, Ca 4, Ca 5, Ca 6, Ca 7 e Ca 8, estarem mais distantes da amostra considerada como amostra padrão, elas podem ser utilizadas com fins terapêuticos. Entretanto, algumas delas apresentam um composto diferente da amostra

padrão, que não foi resolvido; contudo, torna-se importante, em outro momento, a análise desse composto divergente de outras amostras.

A presença desse composto pode indicar a biossíntese de um novo composto devido a fatores abióticos ou adulteração das amostras analisadas. Em um trabalho desenvolvido por Khan e colaboradores (2011) avaliando amostras de *C. angustifolia* por RAPD, verificaram que a espécie *C. acutifolia* é a espécie que apresenta a maior relação com *C. angustifolia*.

8.4.7 Avaliação da metodologia

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre o método proposto, para a metodologia desenvolvida nesse trabalho, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos da repetibilidade para os métodos propostos, utilizando o Teste *t* de Student e ANOVA (análise de variância), presumindo variâncias equivalentes e comparando-os com os resultados obtidos com a análise por UV-vis (QUINTELA *et al.*, 2010). Além disso, a comparação também foi realizada através de análise da PCA em ambas metodologias, bem como através de análise por LC-MS.

A análise por LC-MS pode ser verificada no apêndice C. Embora possa haver correspondência entre as análises, discrepâncias foram encontradas devido a utilização de outro equipamento e outra coluna cromatográfica.

Os resultados do teste *t* para as análises realizadas por UV-vis e comparadas com HPLC são apresentados na Tabela 86.

Tabela 86: Teste *t* pareado para a determinação dos marcadores químicos de *C. angustifolia*. por HPLC e por espectrofotometria UV-vis.

	HPLC	UV
Média	76,6745	79,42391
Variância	79,59738	84,24435
Observações	11	11
Correlação de Pearson	81,92086	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	20	
Stat t	-0,7124	
P(T<=t) uni-caudal	0,242223	
t crítico uni-caudal	1,724718	
P(T<=t) bi-caudal	0,484446	
t crítico bi-caudal	2,085963	

Pode-se observar que em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada (0,96). Os resultados do Teste *t* de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$ (Tabelas 86), demonstraram não haver diferença significativa entre a metodologia proposta em comparação a metodologia por espectrofotometria UV-Vis. Tal fato, o valor de *t* calculado (1,72) é menor que o valor de *t* tabelado (2,08).

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a quantificação dos marcadores químicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 87.

Tabela 87 Análise da variância (ANOVA) das determinações da concentração dos marcadores por HPLC e UV-Vis.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	41,57594	1	41,57594	0,507513	0,048446*	4,351244
Dentro dos grupos	1638,417	20	81,92086			
Total	1679,993	21				

O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,048446 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. De fato, o valor de F calculado (0,5075) é menor que o valor de F crítico (4,3512). A análise de variância (ANOVA) dos resultados

obtidos (Tabelas 87) demonstrou que não haver diferenças significativas entre as metodologias ($\rho = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias (Figura 141) evidencia que não há diferenças entre as metodologias, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a metodologia proposta é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *C. angustifolia*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

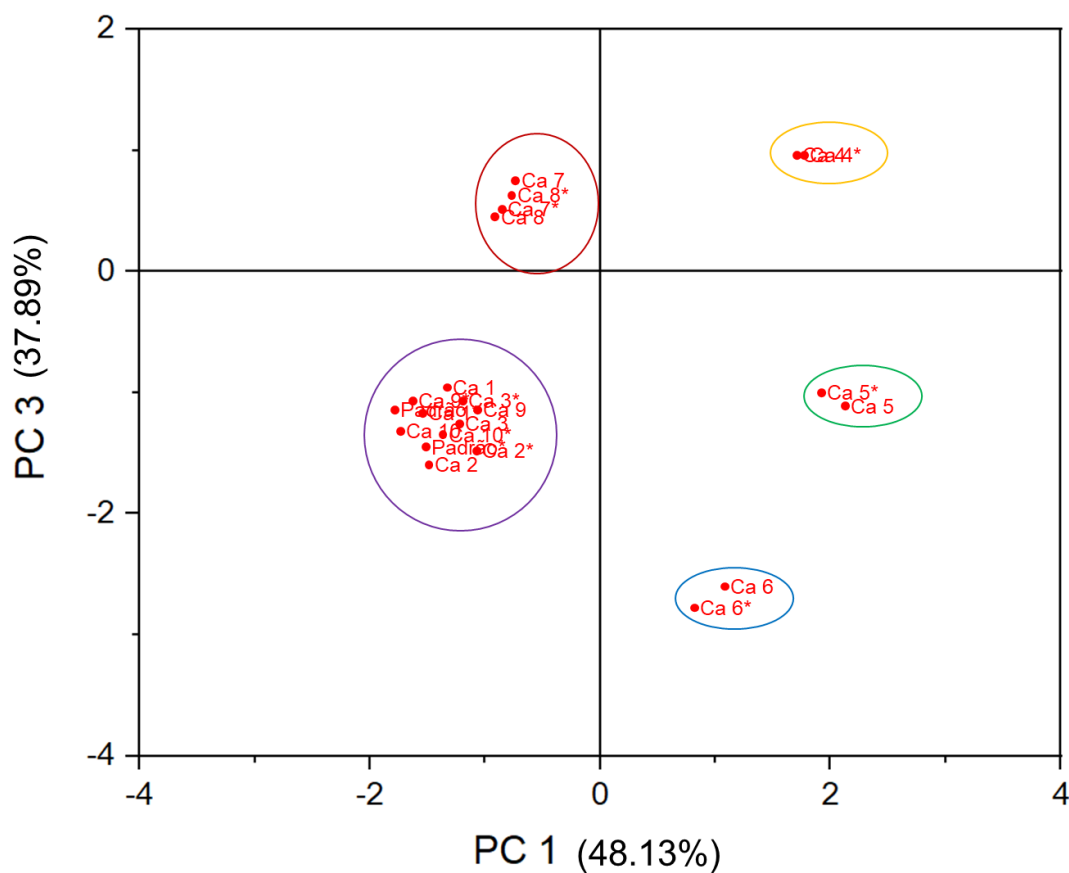


Figura 141: Gráfico de pesos PC1 x PC2 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.



Fonte: <https://medium.com/invironment/the-gifts-of-king-plantago-6d2a90a3557e>

Tanchagem

9. *Plantago ovata* (plantago)

9.1 A Família Plantaginaceae

A família Plantaginaceae, comumente incluída na ordem Plantaginales, subclasse Asteridae (CRONQUIST, 1988), foi reclassificada na ordem Lamiales devido a diversos estudos filogenéticos, morfológicos, embriológicos e químicos, que deslocaram os dois demais gêneros para o nível de subgêneros (RAHN, 1996). Atualmente é aceita a inclusão de 90 gêneros e 2000 espécies em Plantaginaceae (ALBACH *et al.*, 2005; APG, 2016), que em razão da diversificação evolutiva resultaram nas mais variadas morfologias, sendo que no Brasil são descritos 25 gêneros e 130 espécies.

Especificamente sobre o gênero *Plantago*, em torno de 250 espécies são conhecidas mundialmente, com distribuição principalmente nas regiões temperadas, incluindo o sul e sudeste do Brasil. No Brasil existem 16 espécies do gênero *Plantago*, popularmente conhecidas como tansagem ou tanchagem, sendo seis dessas espécies endêmicas (SOUZA e HASSEMER, 2016).

Em sua grande maioria, as espécies de *Plantago* são ervas perenes ou anuais, de caráter invasor, distribuição restrita a cosmopolita e difícil taxonomia, tendo nos tricomas e sementes as maiores diferenças morfológicas (RAHN, 1996; RØNSTED *et al.*, 2002; ISHIKAWA *et al.*, 2009; MEUDT, 2012). As tanchagens são muito utilizadas na medicina popular, tendo as atividades anti-inflamatória e cicatrizante como as mais descritas (LORENZI, 1982; CHIANG *et al.*, 2003), e as espécies *P. australis* L., *P. lanceolata* L., *P. major* L. e *P. ovata* Forssk. as mais estudadas (HELFER *et al.*, 2011).

9.2 Farmacologia do gênero *Plantago* e de seus constituintes fitoquímicos

A família Plantaginaceae tem sido alvo de diversos estudos norteados pela relação entre a composição fitoquímica de suas espécies e atividades farmacológicas, sejam elas *in vitro* ou *in vivo*. No gênero *Plantago*, mais especificamente, os extratos *n*-hexano e etil-acetato de *P. asiatica* L. foram testados quanto à sua atividade antioxidante pelo método de capacidade de absorbância de radicais oxigenados. Os resultados demonstraram que a forma etil-acetato do extrato exerceu notável capacidade sequestrante de radicais livres (AMAKURA *et al.*, 2012).

Muito utilizadas na medicina chinesa, *P. depressa* Willd. e *P. lanceolata* foram descritas em diferentes estudos como portadoras de atividade gastroprotetora. A primeira

espécie foi eficaz em casos de constipação e a segunda, em um estudo mais aprofundado com seu extrato etanólico, teve seus efeitos antiespasmódicos reproduzidos em modelos de contração do íleo e da traqueia em porquinhos-da-índia (FLEER e VERSPOHL, 2007; SHEN *et al.*, 2010). A *P. lanceolata* também possui descrita atividade antioxidante pela redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) em ensaios *in vitro* (ADAM *et al.*, 2009).

O extrato etanólico das folhas de *P. major*, por sua vez, foi testado em ratos submetidos ao modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol. Os resultados demonstraram marcante redução de citocinas pró-inflamatórias, bem como dos níveis séricos de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), importantes marcadores de disfunção hepática (HUSSAN *et al.*, 2015). Em outro estudo, o mesmo tipo de extrato apresentou atividade sequestradora de radicais livres em ensaios com mitocôndrias de fígado de rato e na linhagem de carcinoma hepatocelular humano (MELLO *et al.*, 2015). Por fim, o extrato hidroalcoólico da mesma espécie foi submetido a testes *in vivo* para o tratamento da asma e comparado ao medicamento padrão, a teofilina. Os achados revelaram que ratos asmáticos tratados com o extrato de *P. major* apresentaram normalização das características histopatológicas do pulmão, evidenciando sua atividade protetora contra a doença (FAROKHI e KHANESHI, 2013).

Amplamente empregada na medicina popular, diversas preparações de *P. ovata* foram relatadas na literatura devido a uma gama de atividades farmacológicas. Suas fibras, por exemplo, demonstraram efeito protetor na mucosa duodenal de coelhos submetidos a lesões por ácido acetilsalicílico (AAS), provavelmente mediante a limitação da penetração do AAS nas células do epitélio local. De maneira semelhante, suas folhas e sementes possuem relatos de eficácia no tratamento de úlceras pépticas e da constipação (FERNÁNDEZ-BAÑARES *et al.*, 1999; SAHAGÚN *et al.*, 2015), bem como na redução do desconforto gastrointestinal causado pela doença de Parkinson, estabilizando os níveis séricos do medicamento padrão do tratamento, a levodopa, aumentando sua eficácia terapêutica (FERNANDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2014).

Um estudo ecológico realizado na Espanha também correlacionou o consumo de *P. ovata* e a mortalidade por câncer colorretal, e os achados revelaram que, entre 1995 e 2000, o consumo da planta foi inversamente proporcional à mortalidade pela doença, com valor significativo (LÓPEZ *et al.*, 2009). Quanto à atividade hipolipemiante, a casca de *P. ovata* é conhecida por sua propriedade redutora dos níveis séricos de colesterol, e este efeito foi comprovado também pelas suas sementes, que em um modelo *in vivo*

diminuíram os níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) mediante alteração do metabolismo hepático e ação direta na regulação enzimática da síntese e catabolismo do colesterol (ROMERO *et al.*, 2002).

O gênero *Plantago* contém quatro grupos principais de compostos biologicamente ativos: compostos fenólicos, flavonóides, glicosídeos iridóides e terpenóides (RØNSTED *et al.*, 2000; SAMUELSEN, 2000). Essas classes compreendem dezenas de metabólitos e têm sido amplamente estudadas em razão da etnofarmacologia associada às tansagens.

Os compostos fenólicos têm papel essencial na reprodução, crescimento e defesa das espécies vegetais, bem como são responsáveis pela coloração de plantas e pelo sabor dos frutos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2009). Dentre esses, o ácido clorogênico tem descritas as atividades antioxidante em modelos *in vitro* e de isquemia intestinal, antidiabética e como potencializador dos efeitos do 5-fluorouracil em modelos *in vitro* utilizando linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (SATO *et al.*, 2010; CHOWDHURY *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015).

Dois compostos dessa classe foram inicialmente isolados em plantagináceas e possuem atividades farmacológicas descritas na literatura. A plantaginina foi estudada em razão de seu efeito protetor na membrana celular renal por meio de ensaios *in vitro* em células do túbulo proximal, demonstrando efetiva prevenção da perda de lactato desidrogenase local, comprovando sua elevada proteção da membrana renal (YOKOZAWA *et al.*, 1999), enquanto que o plantamajosídeo teve a atividade antiespasmódica testada e comprovada em modelos *in vivo* utilizando porquinhos-da-índia (FLEER e VERSPOHL, 2007).

Os flavonóides compõem um dos maiores grupos de produtos naturais encontrados na natureza, caracterizando-se como importante fonte de novos compostos com potencial terapêutico (CAZAROLLI *et al.*, 2008). A apigenina, por exemplo, teve atividade inibitória comprovada em modelos celulares de melanoma, leucemia e glioblastoma (WANG *et al.*, 1999; CALTAGIRONE *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2015). A baicaleina exibiu atividade sinérgica com penicilâmicos contra *Staphylococcus aureus* produtores de penicilinas. Da mesma forma, induziu citotoxicidade e supressão de metaloproteinases em células de câncer mamário, e atividades anti-inflamatória mediante inibição de marcadores pró-inflamatórios em modelos *in vivo* de pancreatite e mastite, e antioxidante *in vivo* na proteção renal contra danos causados pela cisplatina e *in vitro* na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (REINA *et al.*,

2013; CHANG *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; QIAN *et al.*, 2015; SAHU *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015).

A luteolina, um flavonoide amplamente encontrado em diversas plantas, teve evidenciada em ensaios *in vitro* e *in vivo* as propriedades antiespasmódica, anti-inflamatória e neuroprotetora, antimicrobiana contra *Candida glabrata*, antitumoral por inibição da angiogênese local e protetora da membrana celular renal. A rutina, ou vitamina P, tem mostrado efeitos similares sobre a integridade renal, além de efeitos inibitórios contra linhagens celulares de glioblastoma (YOKOZAWA *et al.*, 1999; FLEER e VERSPOHL, 2007; TALIB *et al.*, 2012; AMBASTA *et al.*, 2015; NABAVI *et al.*, 2015).

Os iridoídes constituem uma importante classe de metabólitos no reino vegetal, atuando principalmente na proteção das espécies contra predadores, sendo por isso, encontrados em um largo grupo de plantas, geralmente na forma de glicosídeos (DINDA *et al.*, 2007; TUNDIS *et al.*, 2008). Neste grupo, a aucubina tem sido amplamente estudada, tendo comprovada sua eficácia *in vitro* na redução da lipotoxicidade e do estresse do retículo endoplasmático na doença hepática gordurosa não alcoólica, no tratamento de alergias inflamatórias, na inibição de marcadores pró-inflamatórios e radicais livres e na proteção de fibroblastos de pele humana contra a radiação ultravioleta do tipo B (UVB). Da mesma forma, em um modelo *in vivo*, o composto apresentou atividade cicatrizante em feridas orais, acelerando a recuperação da matriz epitelial em ratos (HO *et al.*, 2005a; HO *et al.*, 2005b; PARK *et al.*, 2007; SHIM *et al.*, 2007; OKU *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014).

Outro iridoíde largamente analisado é o catalpol, que em modelo celular apresentou capacidade de inibir a proliferação celular e induzir apoptose em células de câncer ovariano, reduzir a apoptose neuronal e a secreção de marcadores pró-inflamatórios. Em experimentos envolvendo linhagens celulares e ratos, o composto atenuou o déficit cognitivo e estresse oxidativo, os danos neuronais e aumentou a angiogênese pós-oclusão arterial; produziu efeito antidepressivo similar ao cloridrato de fluoxetina; preveniu o envelhecimento ovariano e a falência renal; reduziu a alergia inflamatória e a pancreatite aguda. Finalmente, um estudo conduzido com testes *in vitro* em células de linfócitos humanos e *in vivo* em ratos comprovaram a atividade radioprotetora do catalpol mediante redução da produção de radicais livres (PARK *et al.*, 2007; OKU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2014; ZHU

et al., 2010; HAICHENG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015).

O asperulosídeo desempenhou importante atividade hipolipemiante em ratos, reduzindo o peso corporal, a ingesta de alimentos e os níveis plasmáticos de glicose e lipídeos, bem como a alergia inflamatória e os sintomas de artrite reumatoide em modelos *in vivo* com ratos e *in vitro* com lisozimas de ovos de galinha, respectivamente (LI *et al.*, 2006; OKU *et al.*, 2011; FUJIKAWA *et al.*, 2012). O ácido geniposídico e o mussaenosídeo também apresentaram características anti-inflamatórias, sendo o primeiro detentor de propriedades antioxidantes, todos em ensaios *in vitro* (PARK *et al.*, 2007; VOGL *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Outra classe, os terpenoides são os constituintes básicos dos óleos essenciais em plantas, atuando principalmente como repelentes, hormônios e na interação entre diferentes espécies vegetais e com seus predadores e patógenos (GRASSMANN, 2005). Dentre os representantes desse grupo, o linalol demonstrou efeitos analgésicos ao reduzir a dor aguda em ratos, induziu citotoxicidade via estimulação da imunidade antitumoral em linhagens celulares de câncer de cólon, fígado, mama e pulmão, e apresentou atividade antioxidante por meio da inibição da peroxidação lipídica e do sequestro de radicais livres em ensaios *in vitro* com pâncreas de ratos (OBOH *et al.*, 2015; YANG, *et al.*, 2015).

O β -sitosterol, em estudos *in vitro* e *in vivo*, revelou importante atividade quimiopreventiva contra modelos de câncer de cólon, e sua propriedade anti-inflamatória foi evidenciada em testes *in vitro* por indução de edema de pata em ratos (BASKAR *et al.*, 2010; CHITTUR *et al.*, 2011; BHALKE e PAL, 2012). O ácido 18 β -glicirretínico, por sua vez, mostrou resultados promissores no tratamento da malária, inicialmente em triagem *in vitro* utilizando *Plasmodium falciparum*, posteriormente confirmados em ensaios *in silico* seguidos de um modelo de infecção em ratos. Ainda, o mesmo composto foi empregado em ensaios *in vivo* com ratos, como estratégia terapêutica na esclerose múltipla, sendo capaz de modular a ativação da micróglia, promover a remielinização e inibir a inflamação do sistema nervoso (KALANI *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2015).

Por último, um conjunto de dois ácidos triterpênicos é alvo de diferentes estudos envolvendo inúmeros alvos terapêuticos. Os ácidos oleanólico e ursólico vêm sendo amplamente testados e ambos demonstraram possuir as atividades antidiabética por inibição da enzima α -glicosidade e regulação da sinalização da insulina, antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, e hepatoprotetora e hipolipemiante via inibição da peroxidação lipídica em ensaios *in vivo* com ratos (HO *et al.*, 2005b; LEE *et al.*, 2013;

LEE *et al.*, 2014; OKU *et al.*, 2011; REINA *et al.*, 2013; SHIM *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015; REZAEI-GOLMISHEH *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante desses dois compostos também é conhecida, sendo o ácido oleanólico, em modelos experimentais com ratos, capaz de recuperar a atividade de enzimas antioxidantes e melhorar as funções renal e hepática, além de agir indiretamente na proteção contra a citotoxicidade induzida por radicais livres, uma vez que aumenta a expressão de fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo (GAO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010a). De maneira semelhante, o ácido ursólico suprimiu a geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias de ratos, conferindo-o possível caráter cardioprotetor, e também mediou efeito protetor no dano ao DNA gerado por radicais livres induzidos por radiação UVB (RAMACHANDRAN e PRASAD, 2008; LIObIKAS *et al.*, 2011).

No que diz respeito à atividade antitumoral, tanto o ácido oleanólico como o ursólico possuem diversos mecanismos descritos. O ácido oleanólico apresentou considerável inibição tumoral em camundongos transplantados com células de câncer pancreático humano e inibição da proliferação e aumento do estresse oxidativo em linhagens celulares de adenocarcinoma mamário (HSU *et al.*, 2005; JUTOORU *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-QUESADA *et al.*, 2015). O ácido ursólico, por sua vez, exerceu bloqueio do crescimento tumoral em linhagem celular de sarcoma, inibiu a proliferação de linhagens tumorais de leucemia e câncer de língua, e induziu apoptose em células dos cânceres de mama, fígado e estômago, fragilizou os mecanismos de sobrevivência de células de carcinoma pulmonar e aumentou a citotoxicidade em células de glioma (MANU e KUTTAN, 2008; WANG *et al.*, 2010b; WANG *et al.*, 2012; MAZUMDER *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014a; KIM e MOON, 2015; KIM *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Em estudos distintos, o ácido oleanólico reduziu o estresse oxidativo em comparações realizadas entre células de câncer de mama e de epitélio normal, inibiu potencialmente a enzima acetilcolinesterase, reduzindo a morte neuronal e o déficit de memória induzida pelo acúmulo de placas β -amiloides em ensaios *in vivo* de doença de Alzheimer em ratos, regulou a sinalização pró-inflamatória por supressão gênica, e apresentou propriedade antiparasitária contra *Leishmania donovani* (YOO e PARK, 2012; HWANG *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-QUESADA *et al.*, 2015). Por outro lado, o ácido ursólico melhorou a atuação de enzimas-chave no controle do metabolismo lipídico e regulou a intolerância à glicose, reduzindo a esteatose hepática e mostrando-se como um potente candidato no tratamento da doença hepática gordurosa

não alcoólica e da obesidade, bem como teve papel neuroprotetor contra a doença de Alzheimer, uma vez que foi capaz de inibir a acetilcolinesterase, reduzir os danos oxidativo causados pelo acúmulo de placas β -amiloides e bloquear suas citocinas pró-inflamatórias (KUNKEL *et al.*, 2012; YOO e PARK, 2012; LI *et al.*, 2014b).

9.2.1 *Plantago ovata* Forssk.

Plantago ovata (Figura 142) comumente chamado de "Trigo Indígena do Deserto" é uma pequena erva anual (10-45 cm de altura) de regiões arenosas temperadas (JAMWAL, 2000). A espécie é originária do oeste da Ásia (PEREIRA e FERNANDES, 2012). Distribui-se principalmente na Índia, Irã, norte da África, Paquistão, Bangladesh, além de naturalizada em outros países do Hemisfério Norte. Diversos nomes são encontrados na literatura, tanto para a planta quanto para partes específicas da mesma. Os principais descritos foram psyllium, psillium, psílio, ispaghule, ispaghula, isabgol, plantin, yusubgul (BACHI *et al.*, 1984; .ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ALBERTASSE *et al.*, 2010).



Figura 142: Ilustração de *Plantago ovata* Forssk.

De acordo com a literatura, tanto a semente quanto a testa das sementes de *Plantago ovata* Forssk. são farmacógenos. Em compêndios oficiais, monografias de ambas as partes são apresentadas. A USP (2012) apresenta monografia para “*Plantago Seed*” (tradução literal: sementes de *Plantago*), definida como sementes limpas e secas de *Plantago ovata* Forssk., *Plantago psyllium* L. ou *Plantago indica* L. (*Plantago arenaria* Waldst. & Kit.). Já o nome “*Psyllium Husk*” (tradução literal: casca de psílio) é

definido como testa (em algumas referências sob os termos casca, epiderme ou tegumento, ver observação abaixo) seca e limpa das sementes de *Plantago ovata* ou *Plantago arenaria* (*Plantago psyllium*). Já na Farmacopeia Britânica (2009), a *Ispaghula husk* (tradução literal: casca de ispaghula) é definida como a epiderme e camadas adjacentes removidas da semente de *Plantago ovata*, enquanto que *Ispaghula seed* (tradução literal: semente de ispaghula) é definida como sendo as sementes secas de *Plantago ovata*. A Farmacopeia Brasileira adota, apenas a testa das sementes de *Plantago ovata* em sua monografia desde 2014 (ANVISA, 2014)

As sementes de *Plantago ovata* Forssk são elípticas a ovais, naviculares, medindo 1,5 a 3,5 mm de comprimento, 1 a 2 mm de largura no diâmetro maior e 1 mm de espessura (Figura 143). Sua coloração é bege-rosada a marrom clara, raro marrom mais escuro, e sua superfície é reticulada e opaca, sendo que a superfície convexa apresenta uma mancha longitudinal, alongada e marrom brilhante, que ocupa cerca de um quarto do comprimento da semente, correspondente à posição do embrião que se encontra abaixo da testa; a superfície côncava apresenta uma cavidade profunda, na qual ocorre um hilo arredondado, de coloração amarelada, visível com lente de aumento. A testa consiste de fragmentos ou flocos de coloração bege-rosada, com aproximadamente 2 mm de comprimento e 1 mm de largura, alguns deles com um ponto marrom claro que corresponde à localização do embrião antes de sua remoção da semente (SANZ-BISET *et al.*, 2009; TORRI *et al.*, 2009).



Figura 143: Ilustração das estruturas vegetais de *Plantago ovata* Forssk. (A) Espiga com Semente, (B) Semente e (C) Testa

9.2.2 Prospecção Fitoquímica de *Plantago ovata* Forssk

Muitos elementos foram identificados na semente, tais como proteínas, lipídios, esteróis, triterpenos e glicosídeo de aucubina (Figura 144) (ANVISA 2014).

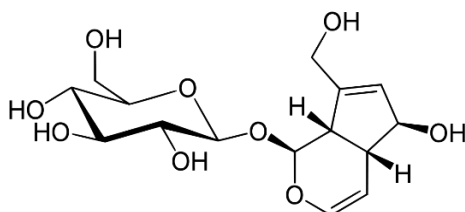


Figura 144 Representação estrutural de glicosídeo de aucubina.

Romero e colaboradores (2002) observou os seguintes constituintes químicos para as sementes de *P. ovata*: teor de proteínas: 15%; lipídios: 5%; minerais: 3%; fibras 55%; açúcares: 20%. Quanto aos lipídios, estes se constituíram de ácido linoleico 39%; oleico 35%; palmítico 12%; esteárico 3%; linolênico 0,8%; araquidônico 0,5% (Figura 145).

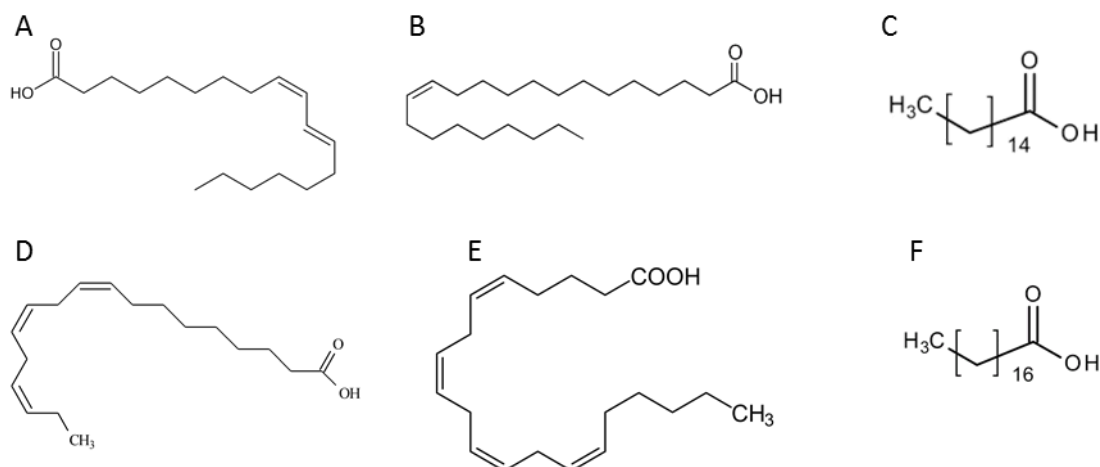


Figura 145: Representação estrutural dos lipídios presentes na testa de *P. ovata*. (A) ácido linoleico, (B) ácido oleico; (C) ácido palmítico, (D) ácido esteárico, (E) ácido linolênico, (F) ácido araquidônico.

Já Romero-Baranzini e colaboradores (2006) descreveu a seguinte constituição: 17,4% de proteína, 6,7% de lipídios, 24,6% de fibras. Com relação às proteínas, 35,8% correspondem à albumina, 23,9% à globulina e 11,7% à prolamina. O óleo apresentou em

sua constituição 40,6% de ácido linoleico, 39,1% de ácido oleico e 6,9% de ácido linolênico. O teor aproximado de lisina foi de 6,82 g/ 100 g de proteínas totais.

O principal constituinte da mucilagem (85%) presente na fração solúvel é o monossacarídeo D-xilose. O esqueleto do polímero é o axilano com ligações 1→3 e 1→4 sem aparente regularidade na sua distribuição. Os monossacáridos nesta cadeia primária são substituídos em C-2 ou C-3 por L-arabinose, D-xilose, and-D-galactouronil- (1→2)-L-ramnose (BRUNETON, 1999) (Figura 146). A mucilagem de sementes de *P. ovata* contém 22,6% de arabinose, 74,65% de xilose e vestígios de outros açúcares e 35% de resíduos terminais não redutores (FISCHER *et al.*, 2004b).

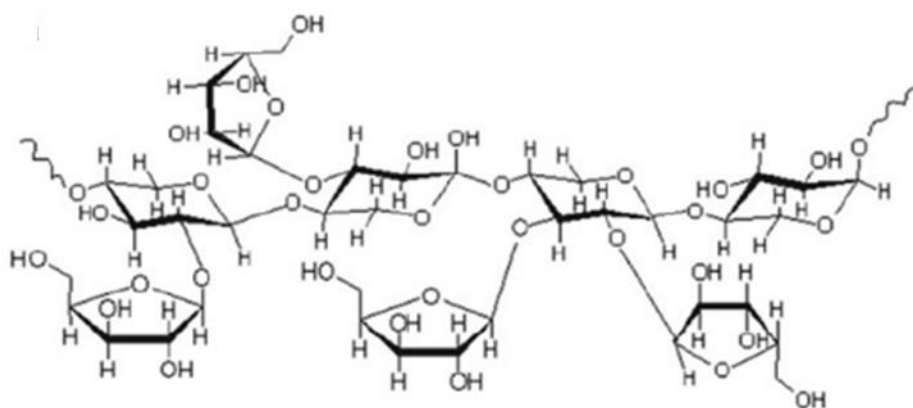


Figura 146: Representação da estrutura química de arabinosil (ácido galacturônico) rhamnosilxilano.

Por outro lado, as folhas de *Plantago* contém uma grande variedade de outros glicosídeos, incluindo flavonoides (baicalina, baicaleína, apigenina da escutelarina, apigenina-7-glicosídeo, plantagoside, luteolina, asperulosídeo, siringina, hispidulina, nepetina, plantagonina) (Figura 147), iridoides (catalpol, derivados de aucubina e acubina, plantarenalósidos) (Figura 148), e terpenóides. Apresenta também contém pequenas quantidades de glucorafenina contendo enxofre e sulforafeno. Outros constituintes incluem ácidos vegetais (cafeico, clorogênico, cinâmico, ferúlico, fumárico, cumárico, plantágico, pluerólico, salicílico, ursólico e ácido vanílico) (Figura 149), alcalóides (boschniakina e o éster metílico do ácido boschniano) (Figura 150), alantoina, mucilagem, açúcares (D-glicose, D-xilose, di-*o*-metilgalactose, L-frutose, sacarose, sorbitol), esteróis, taninos e sais de potássio (DUKE, 2003; SAMUELSEN, 2000; NEWALL *et al* 1996, 2010). Tamura e Nishibe, (2002) determinaram que a concentração

de catalpol e aucubina nas folhas de *P. ovata* estão presentes em maior concentração durante o outono.

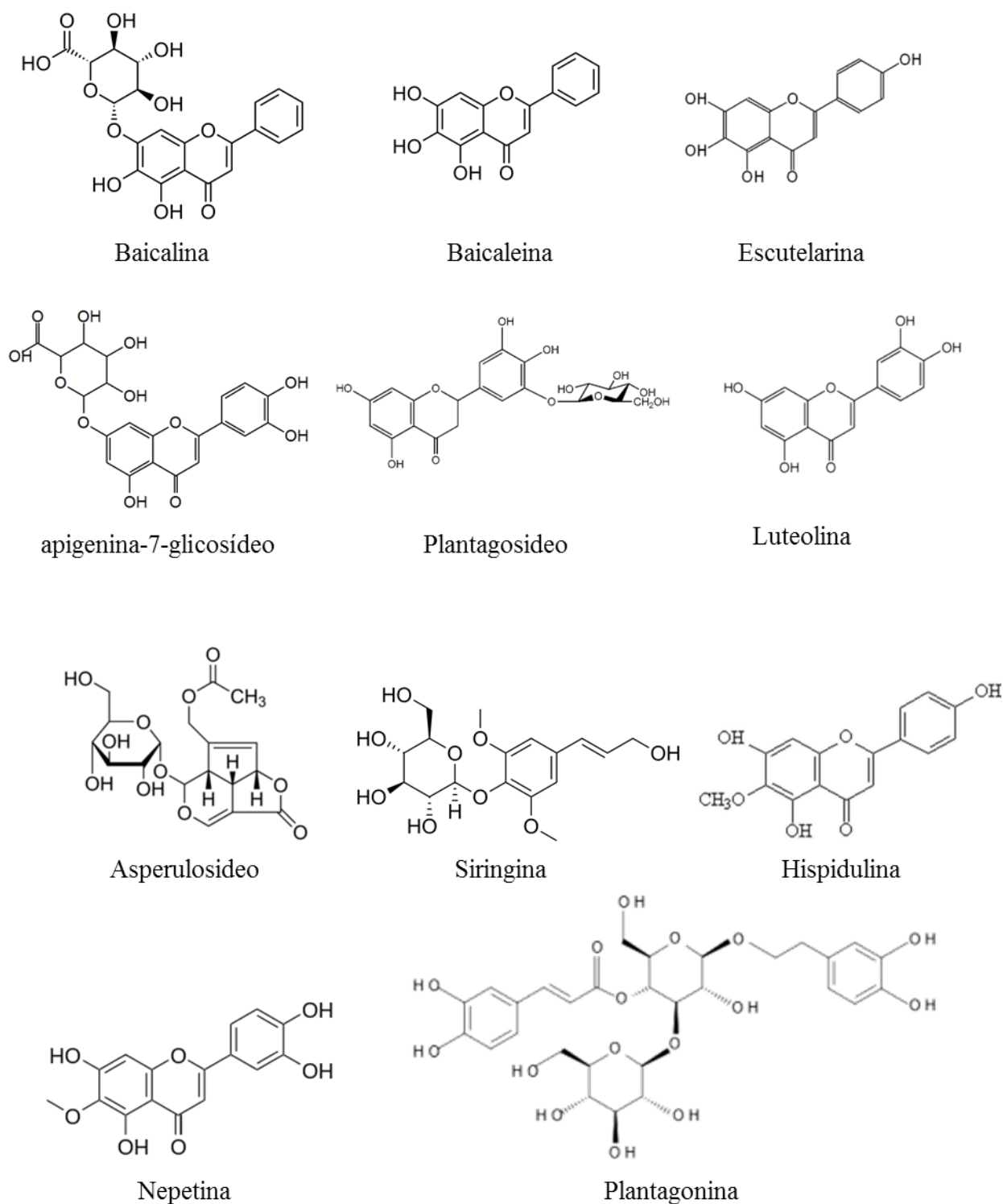


Figura 147: Representação estrutural dos principais flavonoides encontrados em *P. ovata* Forssk.

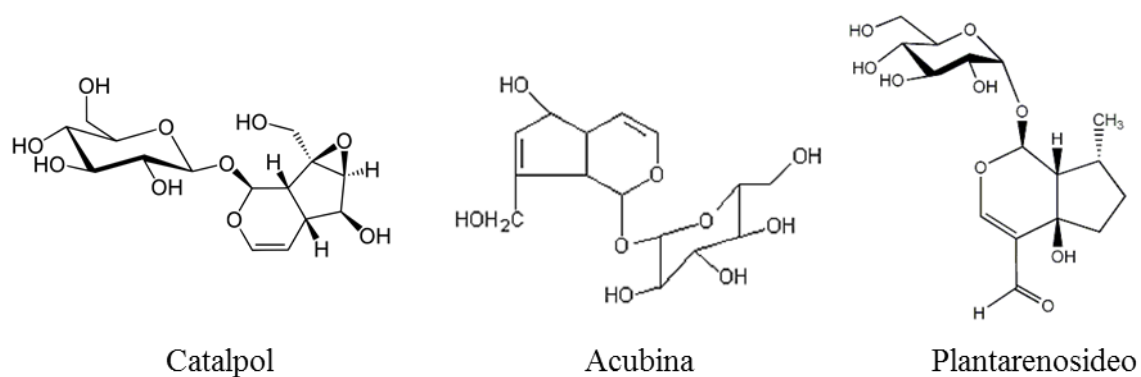


Figura 148 Representação estrutural dos principais iridoides encontrados em *P. ovata* Forssk.

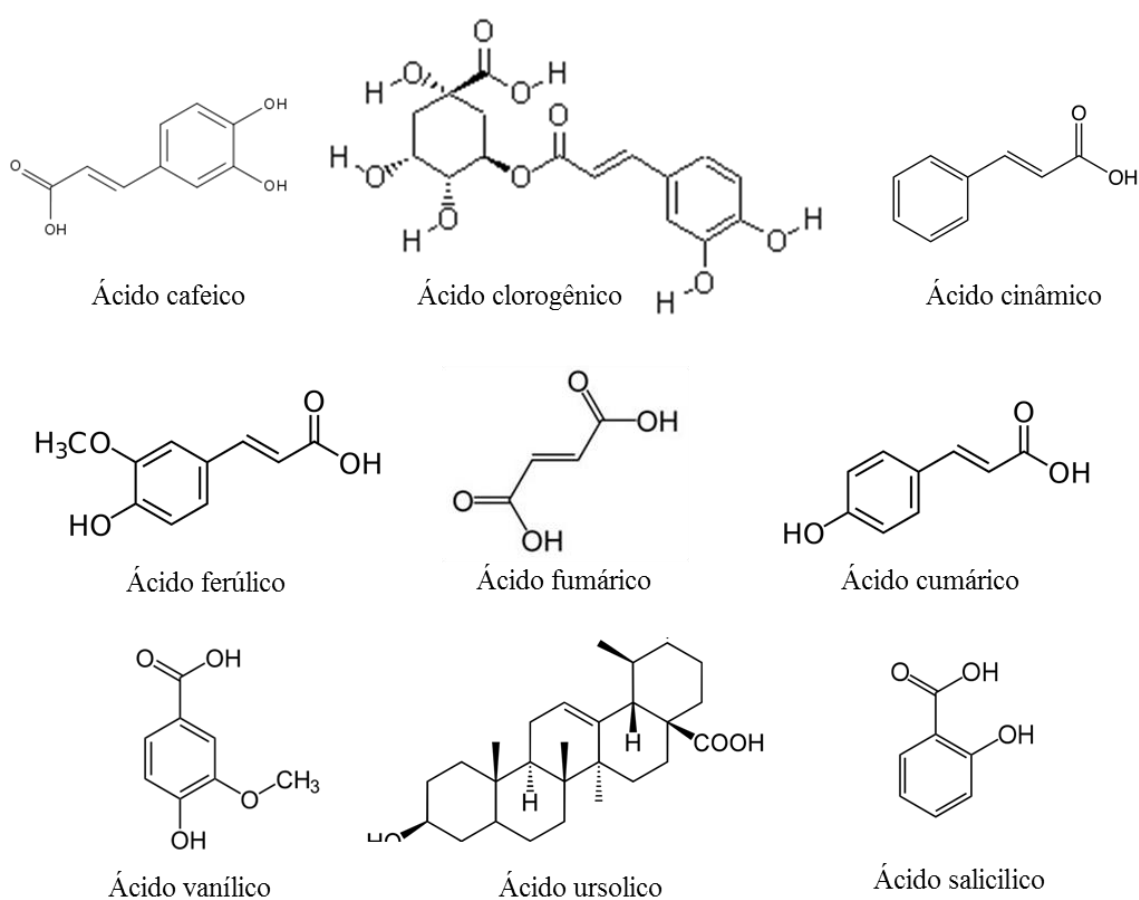


Figura 149: Representação estrutural dos principais ácidos orgânicos encontrados em *P. ovata* Forssk.

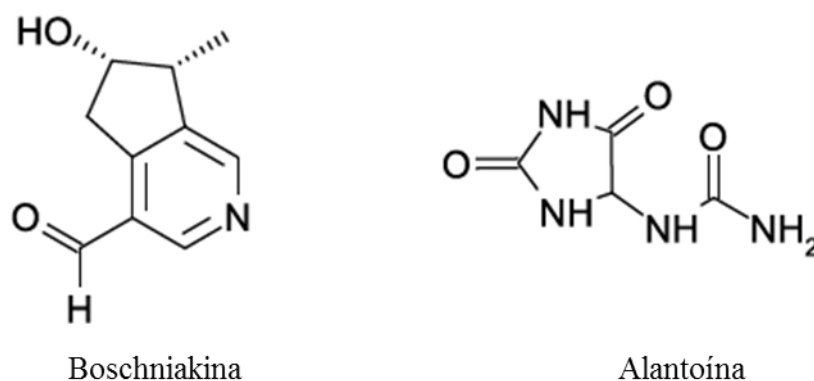


Figura 150: Representação estrutural dos principais alcaloides encontrados em *P. ovata* Forssk.

9.3 Teste de identificação de acordo com compêndios nacionais e internacionais

Existem algumas metodologias para a identificação da droga vegetal, bem como a determinação dos princípios ativos na droga. Conforme Farmacopeia Britânica (2009), deve-se proceder uma Cromatografia em Camada Delgada com as seguintes especificações: Solução teste: Tomar 50 mg da droga vegetal (sementes) ou 10 mg (testa das sementes) pulverizada em um tubo de centrífuga e adicionar 2 mL de uma solução de ácido trifluoracético 230 g/l e agitar vigorosamente. Tapar o tubo e aquecer a mistura a 120 °C por 1h. Centrifugar o hidrolisado, transferir o sobrenadante para um balão de 50 mL, adicionar 10 mL de água e evaporar a solução sob pressão reduzida até a secura. Retomar o resíduo em 10 mL de água e evaporar novamente até a secura sob pressão reduzida. Retomar o resíduo em 2 mL de metanol. Solução referência (a): Dissolver 10 mg de arabinose em uma pequena quantidade de água e diluir para 10 mL com metanol. Solução referência (b): Dissolver 10 mg de xilose em uma pequena quantidade de água e diluir para 10 mL com metanol. Solução referência (c): Dissolver 10 mg de galactose em uma pequena quantidade de água e diluir para 10 mL com metanol. Deve-se aplicar 10 µL de cada solução como banda em uma Placa de Cromatografia com sílica gel utilizando como fase móvel água/acetonitrila (15:85, V/V). Eluir por mais de 15 cm de altura e revelar com ácido amino hipúrico seguido de aquecimento a 120 °C por 5 8 min. A ordem de eluição (da base para o topo) deve ser: galactose (zona amarelada), arabinose (zona laranja rosada) e xilose (zona laranja rosada).

A aucubina foi utilizada como padrão interno para avaliação de sete espécies de *Plantago* (*Plantago lanceolata* L., *P. holosteam* Scop., e *P. schwarzenbergiana* Schur da Servia; e *P. atrata* Hoppe, *P. bellardii* All., *P. coronopus* L., e *P. reniformis* Beck de Montenegro). Para tanto, dois tipos de colunas de fase reversa, coluna Lichrospher RP-18e (250 mm 4 mm, 5 mm) e coluna Zorbax SB-C18 (150 mm 4,6 mm, 5 mm) foram utilizadas.

A presença de ácido ursólico e oleanólico em folhas de *P. major* deve ser determinado com precisão, uma vez que desempenham efeito terapêutico no organismo, dependente da concentração e presença desses compostos no extrato bruto das plantas medicinais. Para tanto, um método rápido por HPLC foi desenvolvido por Zacchigna e colaboradores (2008). Os autores utilizaram o equipamento HPLC da Perkin Elmer (Series 4 Liquid Chromatograph) equipado com a septumless injetor (Rheodyne Injector 7125S), detector (Perkin Elmer LC 235 Diode Array, UV-VIS Digital Spectrophotometric Detector and LC Autocontrol) e Shimadzu C-R3A Chromatopac. A coluna utilizada foi LiChrosorb RP18 column (5 μ m, 250 mm x 4.6 mm i.d., Perkin-Elmer), fluxo 1 mL/min metanol/água/tetrahydrofurano (94:5:1 v/v), pH 5 com ácido acético como fase móvel, detector a 220 nm.

9.4 Resultados e Discussão.

Segundo Snyder (1997), ao iniciar a análise de uma amostra desconhecida é recomendável realizar uma análise cromatográfica utilizando gradiente exploratório linear de 5 a 100% de mistura binária em 60 min em uma coluna de fase estacionária C18 e uma vazão de 1 mL/min.

A partir desta primeira análise, para posterior otimização das condições cromatográficas, devem ser avaliados os seguintes fatores: natureza do modificador orgânico (acetonitrila ou metanol), temperatura do forno e vazão da fase móvel. As colunas de fases estacionárias C18 e hexil-fenil são preferenciais para a otimização das condições cromatográficas de separação, pois sabe-se que para promover a separação dos tipos de compostos provavelmente presentes estas colunas são consideradas adequadas. A coluna de fase estacionária quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C18) é amplamente utilizada quando se deseja avaliar uma amostra vegetal desconhecida. Por ser apolar, seu modo de separação baseia-se nas interações hidrofóbicas de suas cadeias hidrocarbônicas com a parte apolar do soluto a ser analisado. Por outro lado, considerando

“seu potencial de seletividade cromatográfica diferenciada”, as colunas de fase estacionária hexil-fenil têm se popularizado. Seu modo de separação baseia-se nas interações do tipo π - π , o que as tornam mais seletivas para análises de amostras contendo compostos aromáticos (MARTINS, 2008; MALDANER *et al.*, 2010).

Um cromatograma *fingerprint* caracteriza-se por apresentar um perfil cromatográfico, no qual se observa um maior número de bandas possíveis com boa resolução e simetria e estabilidade da linha de base em um tempo de análise razoável. O processo de otimização das condições analíticas para obtenção do cromatograma *fingerprint* nem sempre é trivial, pois o que se tem neste caso, geralmente, é um extrato muito complexo, dificultando a separação de todos os constituintes químicos em uma única corrida (ZHOU *et al.*, 2009)

9.4.1 Desenvolvimento da metodologia analítica.

9.4.1.1 Análise dos marcadores durante o gradiente exploratório

O cromatograma da Figura 151, mostra a separação de todos os compostos em tempo de análise menor que 60 min.

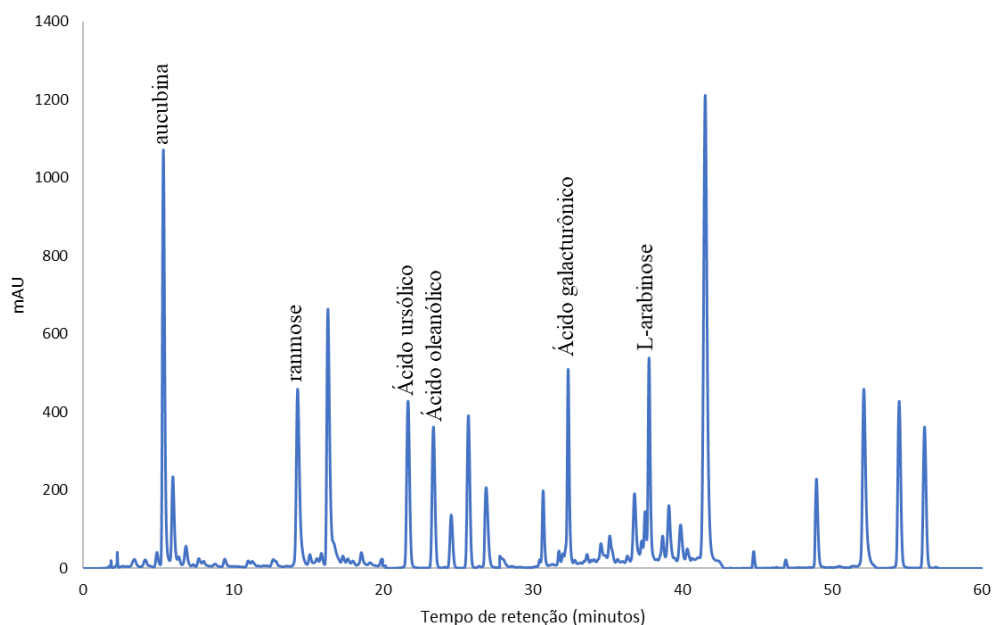


Figura 151: Cromatograma de *P. ovata* obtido através de sistema de eluição Metanol (componente A) e água/MeCN pH 2,5 ajustado com TFA 0,1% (componente B), em gradiente.

A análise da Figura 151 permite a verificação da separação dos constituintes com elevada confiabilidade. Os picos mostram-se bem definidos e com tempos de retenção diferentes, o que caracteriza a análise por HPLC.

A utilização de marcadores químicos para o desenvolvimento da metodologia se dá pelo gradiente exploratório após a determinação do espectro da amostra bruta. Dessa forma, os mesmos parâmetros foram utilizados para a seletividade das análises. A Figura 152 apresenta o cromatograma dos padrões analisados de *P. ovata*.

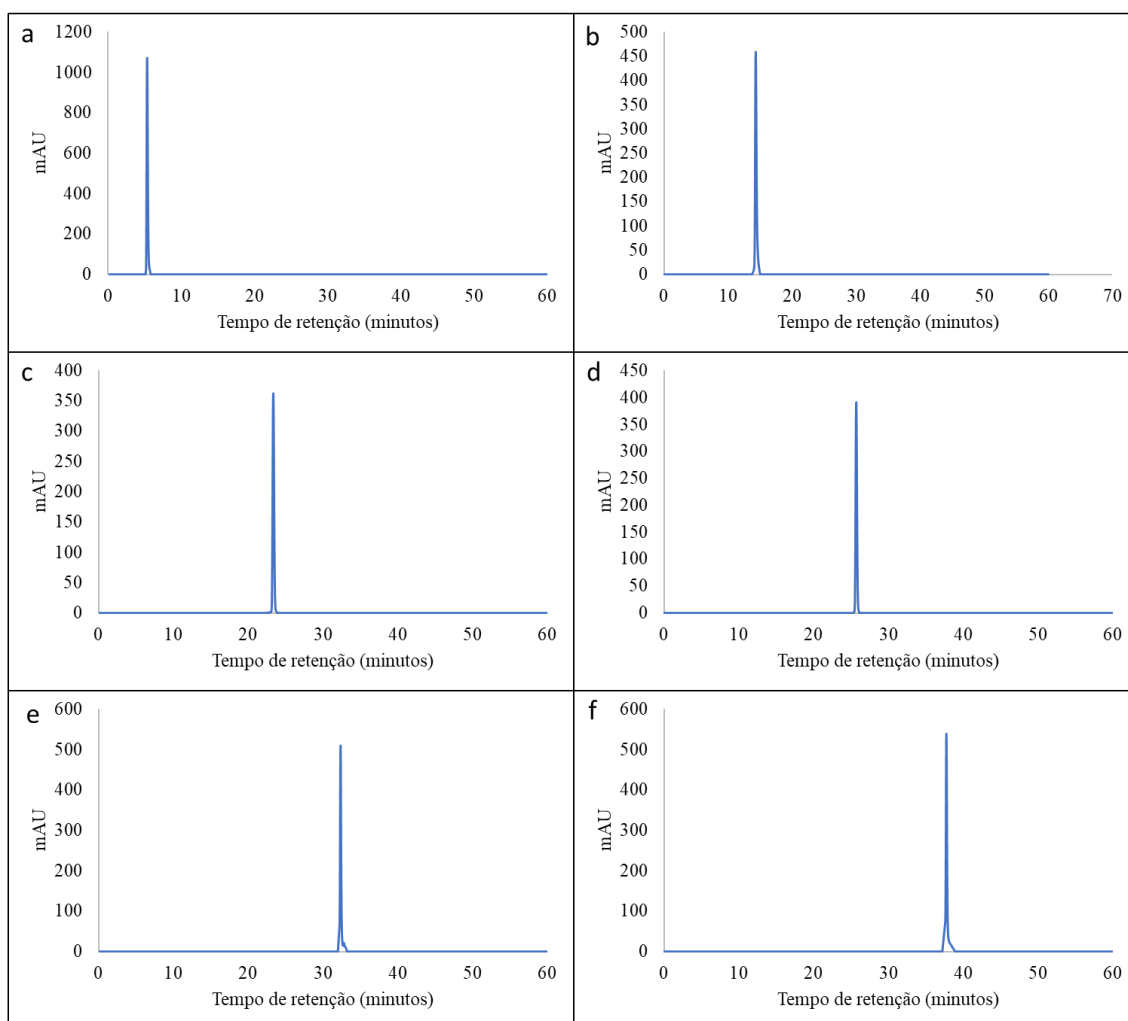


Figura 152: Cromatograma dos padrões utilizados como marcadores para *P. ovata*: Em (a) Aucubina, (b) ramnose, (c) ácido ursólico, (d) ácido oleanólico (e) ácido galacturônico e (f) arabinose.

Entretanto, a análise de parâmetros como tempo de retenção, fator de retenção, seletividade devem ser analisados. Assim, a Tabela 88 apresenta os parâmetros de separação obtidos.

Tabela 88: Combinação de eluição das amostras padrões de *P. ovata*: Aucubina, rmanose, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido galacturônico e arabinose.

Amostra	t_R	k	α	Rs	N
Aucubina	5,35	2,82	1,48		8211,12
Ramnose	14,31	7,53	2,67	8,17	13105,67
Ácido ursólico	21,94	11,55	1,53	3,21	30807,27
Ácido oleanólico	23,50	12,37	1,07	1,08	19683,67
Ácido galacturônico	32,40	17,05	1,38	2,83	16796,16
Arabinose	41,52	21,85	1,28	2,25	16321,05

* **t_R** = tempo de retenção (minutos); **k** = fator de retenção e **α** = fator de separação ou seletividade, **Rs** = Resolução, **N** = Numero de pratos teóricos.

Comparando os valores de *k* e *Rs* obtidos com os valores exigidos pela literatura, (SNYDER *et al.*, 1997), adotou-se estas condições para a separação dos compostos. Isto significa que, nestas condições os compostos analisados estão resolvidos, ou seja, otimamente separados. Na presença de interferentes, analisando amostras reais, este fatores devem continuar constantes. Outros fatores como pH e força iônica da fase móvel não foram estudados, pois o método proposto apresentou-se eficiente. Verificou-se também, que fatores como estes são menos utilizados para separação destes compostos, segundo a bibliografia (BARCELÓ *et al.*, 1992; VITALI *et al.*, 1994; JIMÉNEZ *et al.*, 1997). A Figura 153 apresenta os padrões para análise de *P. ovata*. sumarizados em uma única análise.

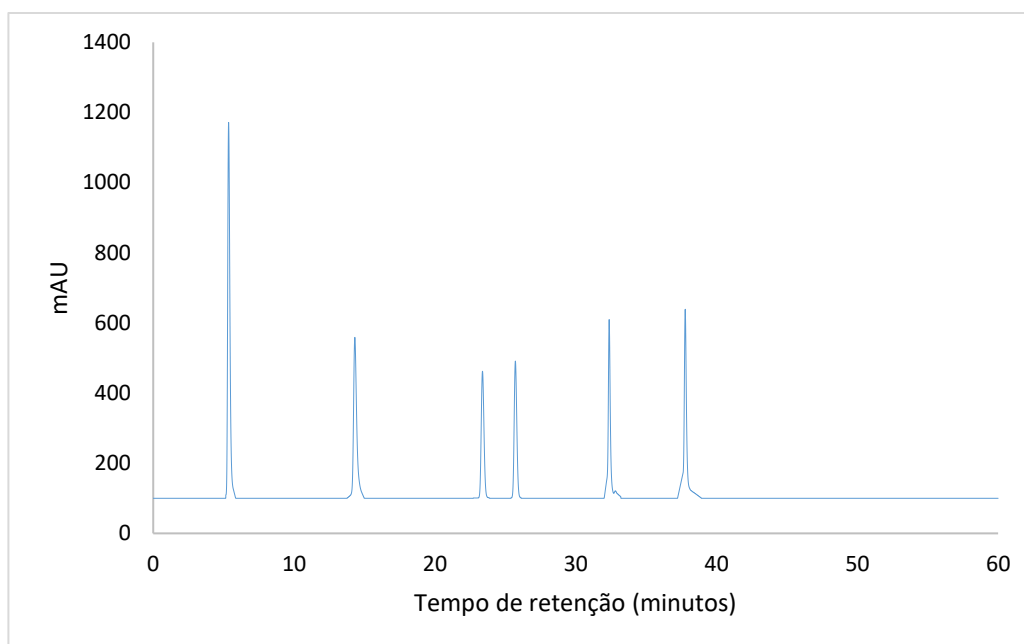


Figura 153: Espectro dos padrões combinados de padrões de *P. ovata*: Aucubina, ramnose, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido galacturônico e arabinose, respectivamente.

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. O valor de resolução calculado foi acima de 2,0, com exceção do ácido oleanólico que foi 1,08, o que mostra a total separação entre os picos. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade, são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA *et al.*, 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos seis marcadores.

9.4.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada composto.

Inicialmente pesquisas bibliográficas foram realizadas para a obtenção de informações sobre métodos já desenvolvidos. Trabalhos anteriores relataram a utilização de comprimentos de onda de 254-290 nm, que poderia ser utilizado como parâmetro inicial para o desenvolvimento do método cromatográfico.

Na Figura 154 são apresentados os espectros de absorção na região do UV e o comprimento de onda de absorção máximo, respectivamente, obtidos na faixa de 200 a

400 nm para os compostos estudados, utilizando para tal fim um detector por arranjo de diodos. Confirmando-se assim o comprimento de onda selecionado para o desenvolvimento do estudo.

Os espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para soluções padrão individuais dos compostos na concentração de 10 ppm foram utilizados para se obter o comprimento de onda máximo de cada composto e também para confirmar a identidade dos analitos na amostra, comparando-se assim o espectro obtido com os espectros dos padrões. Com base nos espectros, foram escolhidos os comprimentos de onda máximo para cada composto, os quais foram monitorizados em casa análise. A melhor absorção para ambos os compostos foi detectada em 254 nm.

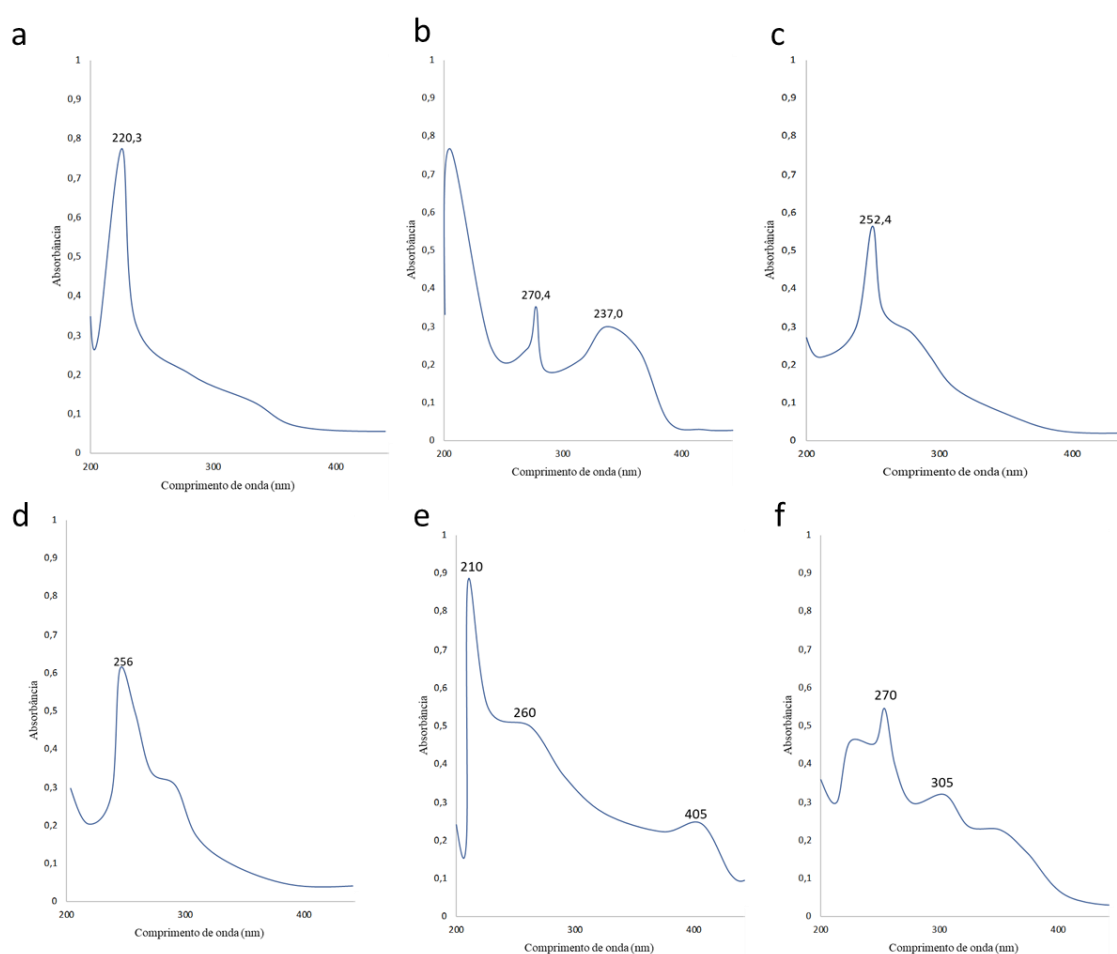


Figura 154: Espectro de UV dos compostos Aucubina (a), ramnose (b), ácido ursólico (c), ácido oleanólico (d), ácido galacturônico (e) e arabinose (f).

9.4.2 Validação do método analítico desenvolvido

9.4.2.1 Avaliação da seletividade do método analítico

O diluente utilizado no preparo das amostras foi injetado nas mesmas condições para verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes, o que foi confirmado como se observa na Figura 155. Os picos que são registrados foram eluídos antes da aucubina que apresenta o menor tempo de retenção (5,35 minutos)



Figura 155: Análise cromatográfica do diluente (metanol) dos marcadores e amostra de *P. ovata*.

A pureza do pico também é aceita como uma das condições de avaliação do parâmetro de seletividade, sendo determinada pelo detector DAD (Figura 156).

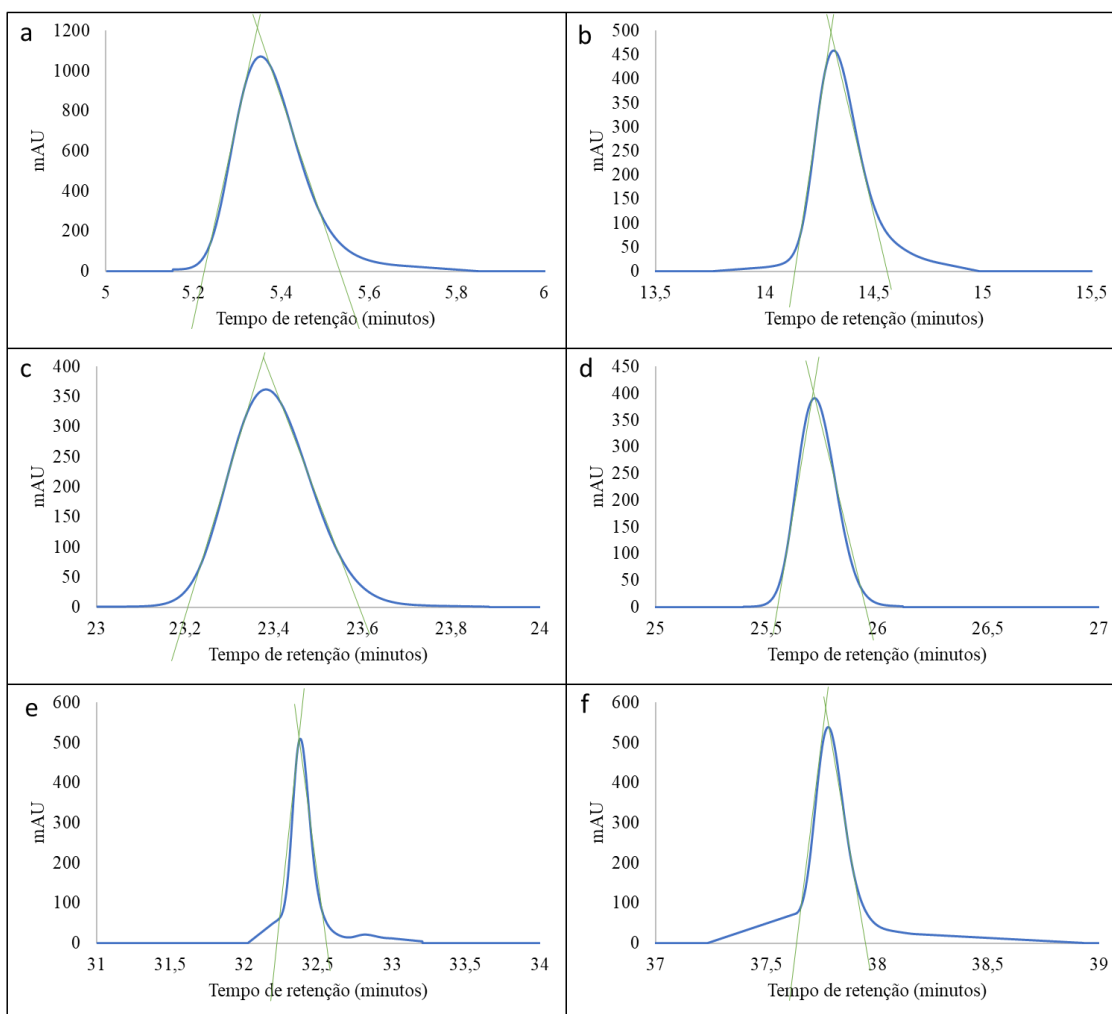


Figura 156: Análise da pureza dos padrões de *P. ovata*: (a), ramnose (b), ácido ursólico (c), ácido oleanólico (d), ácido galacturônico (e) e arabinose (f). A área entre as barras verdes corresponde a área pura.

Pela análise espectral, acredita-se que a pureza foi comprovada, pois nota-se que a maior parte dos picos estão entre as tangentes das retas, o que confere confiabilidade de 95% nas análises. Dessa forma, de acordo com os critérios descritos na legislação brasileira vigente, a metodologia é considerada específica (BRASIL, 2003).

9.4.2.1.1 Adição dos marcadores

A adição de marcadores na amostra de *P. ovata* foi realizada para corroborar a presença dos picos e o tempo de eluição de cada marcador. A Figura 157 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *P. ovata* com o

cromatograma em que houve adição dos padrões e na Figura 158 a análise dos marcadores comparado ao cromatograma de *P. ovata*.

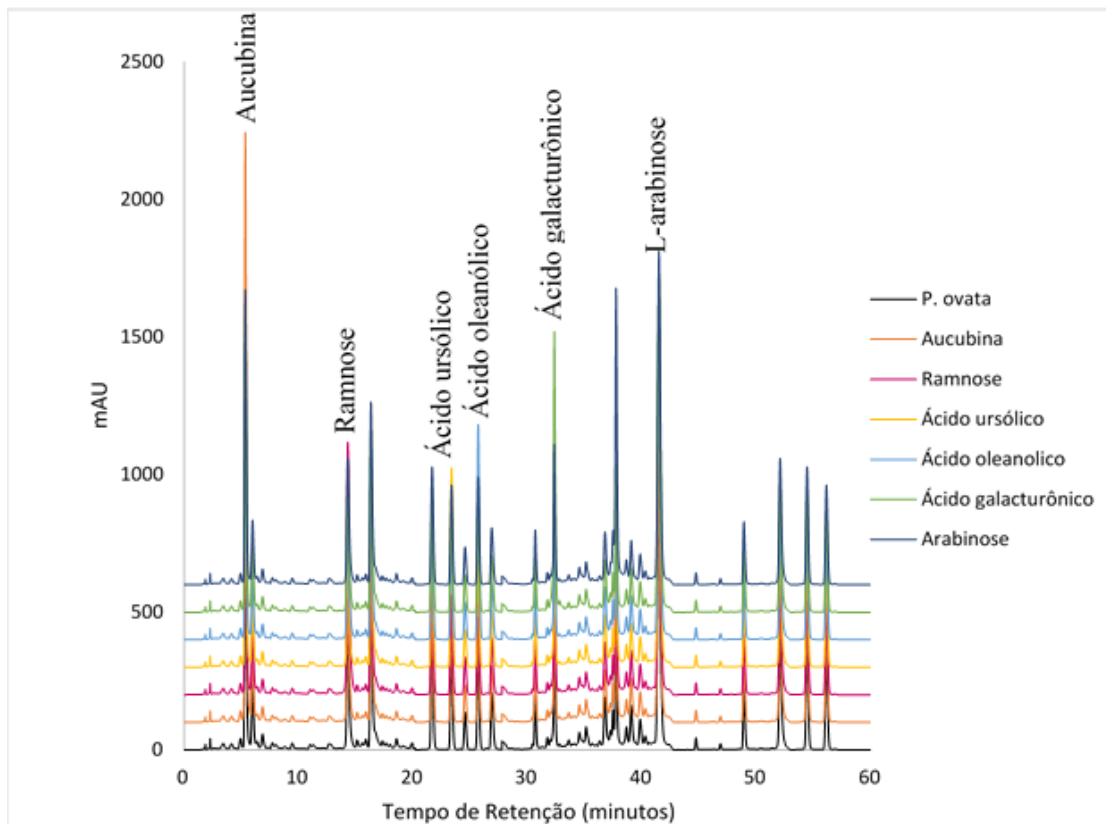


Figura 157: Cromatograma de *Plantago ovata* juntamente com a adição dos marcadores químicos padrões.

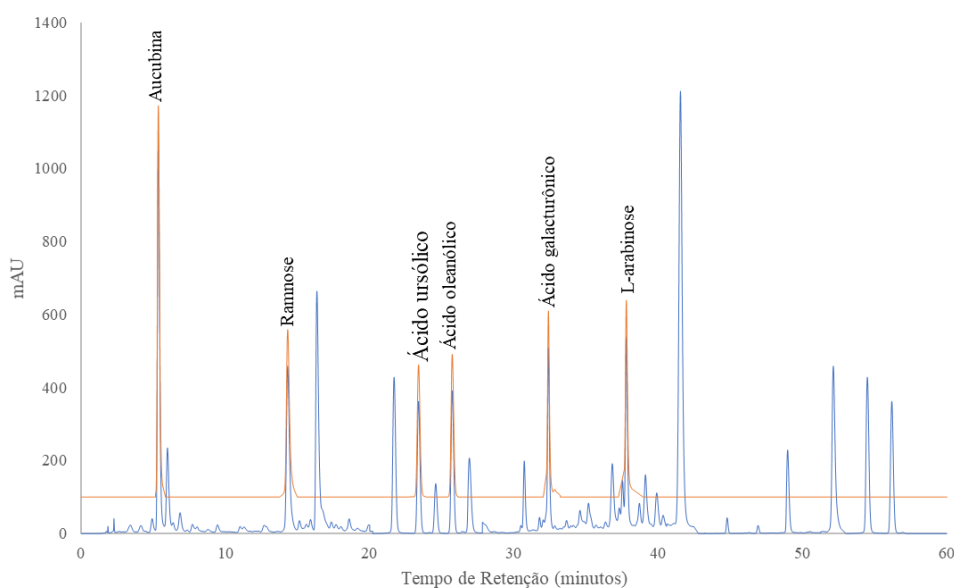


Figura 158: Cromatograma de *P. ovata* comparado aos marcadores químicos padrões: Amostra padrão – identificada (azul), padrões (laranja).

Os espectros de absorção apresentados nas Figuras 157 e 158 demonstram o perfil de absorção da amostra e dos padrões. Pode-se notar que a substância de interesse está presente na amostra, e que o perfil espectral da amostra corresponde ao perfil espectral dos padrões analisados, apontando a seletividade do método em quantificar, de fato, as substâncias de interesse.

Esses resultados corroboram com a seletividade do método no sentido de que não ocorreu co-eluição de produtos de degradação ou compostos constituintes da matriz no mesmo tempo de retenção dos padrões, nas condições analisadas (INMETRO, 2003).

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A CLAE com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu nas substâncias analisadas, por permitir monitoração simultânea de vários compostos, além de fornecer o espectro de absorção característico do cromóforo e a pureza do pico. Portanto, pode-se dizer que o método proposto é capaz de identificar os compostos utilizados como padrões no extrato de *P. ovata* a partir das análises dos tempos de retenção e dos espectros de UV e em relação às coinjeções dos padrões puros em CLAE

9.4.2.1.2 Seletividade

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma forma de avaliar a seletividade em um método analítico por CLAE é o método de adição padrão, pois não é possível obter a matriz isenta do analito. Neste caso, é feito duas curvas analíticas, uma com adição da substância de interesse na amostra e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferências de outros componentes da matriz na determinação da substância de interesse, portanto, o método é seletivo (INMETRO, 2003). A seletividade do método, também, foi comprovada mediante comparação dos valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas representadas nas Figuras 159a-f.

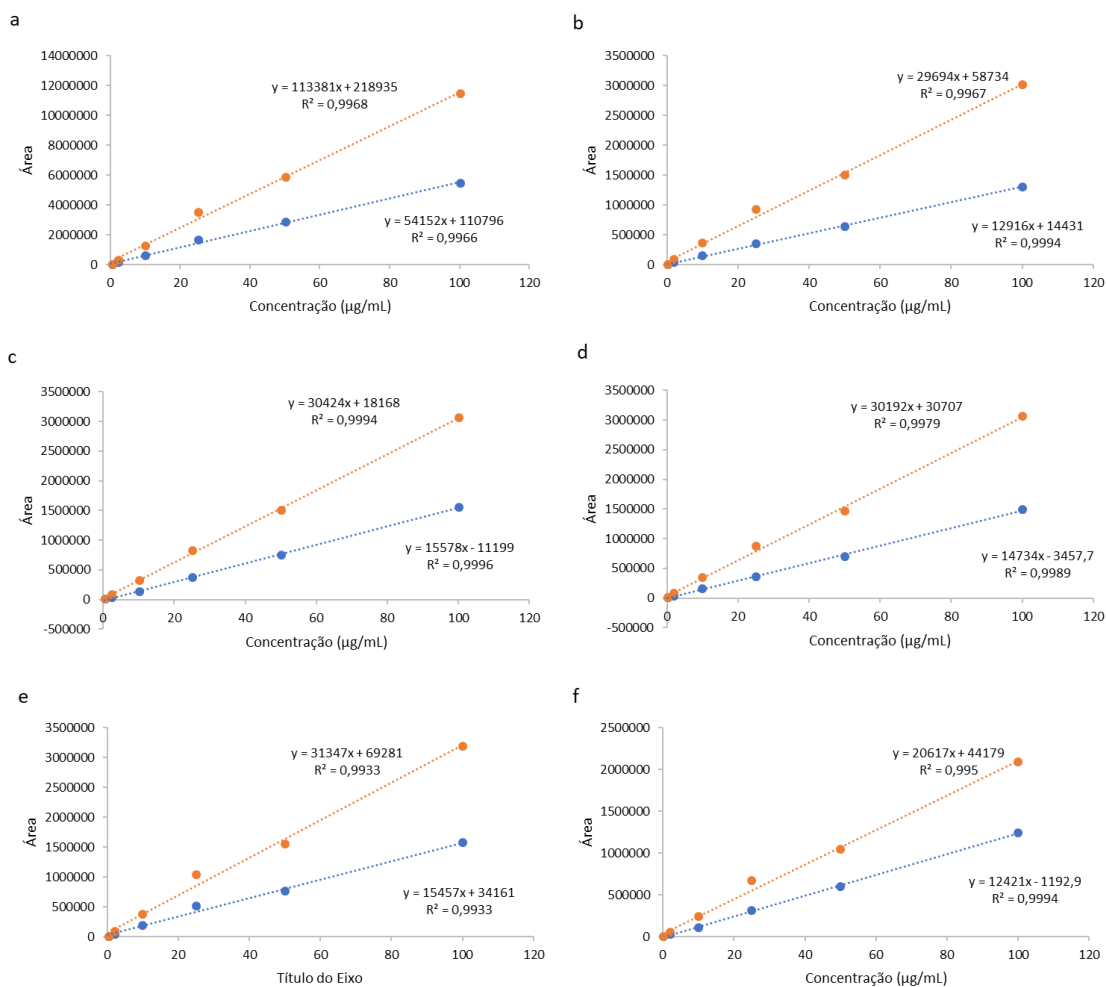


Figura 159: Curva analítica para verificação da seletividade do método para *P. ovata*: Aucubina (a), ramnose (b), ácido ursólico (c), ácido oleanólico (d), ácido galacturônico (e) e arabinose (f). A curva em azul representa o padrão analítico e a curva em laranja representa a adição do padrão.

9.4.2.2 Robustez

Para avaliar a robustez da metodologia, o parâmetro fluxo da fase móvel foi alterado para observar se o método resiste a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A robustez do método foi avaliada a partir da verificação da concentração determinada em relação ao padrão (100 $\mu\text{g/mL}$) e alterando-se o fluxo da fase móvel (Quadro 11).

Quadro 11: Avaliação da robustez através da modificação no fluxo da fase móvel para os padrões de *P. ovata*.

Marcador	Condições Alteradas	Concentração (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	DP	DPR (%)
Aucubina	Método original	100,07	100,50	0,70	0,69
		101,30			
		100,12			
	Fluxo (1,2 mL/min)	100,06	100,11	0,22	0,22
		99,92			
		100,35			
	Fluxo (0,8mL/min)	105,01	105,85	0,73	0,69
		106,32			
		106,22			
Ramnose	Método original	101,05	99,93	1,15	1,15
		98,76			
		99,99			
	Fluxo (1,2 mL/min)	108,05	104,21	4,02	3,85
		104,55			
		100,04			
	Fluxo (0,8mL/min)	105,24	107,88	2,54	2,36
		100,31			
		100,09			
Ácido ursólico	Método original	100,11	99,79	0,32	0,32
		99,48			
		99,77			
	Fluxo (1,2 mL/min)	105,21	104,83	0,53	0,51
		105,06			
		104,22			
	Fluxo (0,8mL/min)	109,15	108,75	0,36	0,33
		108,45			
		108,66			
Ácido Oleanólico	Método original	99,80	100,64	1,61	1,60
		99,63			
		102,49			
	Fluxo (1,2 mL/min)	105,14	105,49	1,07	1,01
		104,64			
		106,69			
	Fluxo (0,8mL/min)	108,80	107,19	2,57	2,40
		108,56			
		104,23			
Ácido Galacturônico	Método original	99,71	101,53	2,09	2,06
		101,06			
		103,81			
	Fluxo (1,2 mL/min)	104,89	106,10	1,48	1,39

Arabinose	Fluxo (0,8mL/min)	105,66	105,68	3,41	3,23
		107,74			
		108,68			
		106,39			
		101,97			
	Método original	100,38	102,39	1,98	1,94
		102,44			
		104,35			
	Fluxo (1,2 mL/min)	105,28	106,73	1,47	1,38
		106,70			
108,21					
Fluxo (0,8mL/min)	107,53	104,30	3,18	3,05	
	104,18				
	101,18				

Os resultados obtidos no quadro acima cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas. De fato, o desvio padrão relativo (DPR) foi baixo. Dessa forma, os dados estão dentro de um índice de confiabilidade de 95%.

9.4.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica elaborada na concentração de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ pois esta foi a menor concentração possível para se determinar a integração da área do pico. Com os dados obtidos da equação da reta, calcularam-se o LD e o LQ, representados na Tabela 89.

Tabela 89: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *P. ovata*.

Padrão	S_m/R_m	LD	LQ
Aucubina	0,7407	0,81	2,70
Ramnose	0,3352	1,79	5,97
Ácido ursólico	2,4000	0,25	0,83
Ácido oleanólico	1,8750	0,32	1,07
Ácido galacturônico	1,3333	0,45	1,50
Arabinose	0,7143	0,84	2,80

Os LD variaram entre 0,25 e 1,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O valor de LD mais baixo foi obtido para o ácido ursólico (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O valor de LQ mais alto foi obtido para Ramnose, com valor igual a 5,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Vale ressaltar, que os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

9.4.2.4 Precisão

A precisão reflete o grau de dispersão dos resultados quando o método é aplicado em várias amostras, desde que seja realizado em um mesmo laboratório com a mesma metodologia de preparo da amostra e fazendo-se uso dos mesmos equipamentos. A precisão é dividida em três categorias (ANVISA, 2003; ICH, 1996): repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão intercorrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

Uma das maneiras de se realizar a determinação da precisão é pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) de seis replicatas. Para a precisão intermediária, geralmente consideram-se medidas nas quais se avalia a influência de variação de equipamento utilizado, analista e/ou dia de análise. Por outro lado, a reprodutibilidade é um parâmetro mais comumente associado com variações entre laboratórios (ICH, 1996).

9.4.2.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações a 100% da concentração teste da solução padrão ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$), executada por um mesmo analista, com o mesmo equipamento em um curto período, conforme apresentado na Tabela 90.

Tabela 90: Dados de repetibilidade para os marcadores de *P. ovata* na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Repetição	Aucubina	Ramnose	Ácido ursólico	Ácido oleanólico	Ácido galacturônico	Arabinose
1	1,056	1,040	1,12	1,048	1,109	1,078
2	1,060	1,044	1,140	1,052	1,121	1,086
3	1,048	1,036	1,080	1,042	1,085	1,063
4	1,057	1,049	1,050	1,053	1,077	1,065
5	1,038	1,035	1,060	1,036	1,071	1,054
6	1,048	1,036	1,090	1,042	1,090	1,066
Média	1,051	1,040	1,090	1,045	1,092	1,069
DP	0,008	0,006	0,035	0,006	0,019	0,012
DPR (%)	0,76	0,53	3,18	0,61	1,77	1,10

A partir dos valores de coeficiente de variação (CV) obtidos na análise de repetibilidade, pode-se assegurar que não há variabilidade significativa nos resultados durante o decorrer da rotina de um dia de análise. De fato, estes resultados apresentaram-se relativamente próximos, com variações inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

9.4.2.4.2 Precisão intermediária

A precisão verificada para os padrões de *P. ovata* no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas Tabelas 91 e 92, respectivamente.

A análise das Tabelas 91 e 92 permitem verificar que não há diferenças significativas entre as análises de precisão, uma vez que desvio padrão relativo foi abaixo de 5%.

Tabela 91: Precisão intra-dia do método para quantificação dos marcadores de *P. ovata* por HPLC, na concentração de 1,00 µg mL⁻¹.

Repetição	Aucubina		Ramnose		Ácido ursólico		Ácido oleanólico		Ácido galacturônico		Arabinose	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
1	1,056	1,068	1,040	1,055	1,120	1,087	1,048	1,061	1,109	1,086	1,078	1,073
2	1,060	1,072	1,044	1,058	1,140	1,099	1,052	1,065	1,121	1,095	1,086	1,081
3	1,048	1,062	1,036	1,048	1,080	1,064	1,042	1,055	1,085	1,068	1,063	1,059
4	1,057	1,073	1,049	1,059	1,050	1,055	1,053	1,066	1,077	1,066	1,065	1,061
5	1,038	1,056	1,035	1,043	1,060	1,052	1,036	1,050	1,071	1,057	1,054	1,050
6	1,048	1,062	1,036	1,049	1,090	1,069	1,042	1,055	1,090	1,071	1,066	1,062
Média	1,051	1,065	1,040	1,052	1,090	1,071	1,045	1,059	1,092	1,074	1,069	1,064
DP	0,008	0,006	0,006	0,006	0,035	0,019	0,006	0,006	0,019	0,014	0,012	0,011
DPR (%)	0,76	0,60	0,53	0,61	3,18	1,75	0,61	0,60	1,77	1,30	1,10	1,04

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

Tabela 92: Precisão inter-dia do método para quantificação dos marcadores de *P. ovata* por HPLC, na concentração de 1,00 µg mL⁻¹.

Repetição	Aucubina		Ramnose		Ácido ursólico		Ácido oleanólico		Ácido galacturônico		Arabinose	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	1,056	1,060	1,040	1,102	1,120	1,158	1,048	0,947	1,109	1,121	1,078	1,139
2	1,060	1,064	1,044	1,119	1,140	1,167	1,052	0,956	1,121	1,132	1,086	1,156
3	1,048	1,056	1,036	1,072	1,080	1,145	1,042	0,933	1,085	1,102	1,063	1,105
4	1,057	1,069	1,049	1,052	1,050	1,149	1,053	0,932	1,077	1,098	1,065	1,083
5	1,038	1,055	1,035	1,056	1,060	1,138	1,036	0,926	1,071	1,092	1,054	1,088
6	1,048	1,056	1,036	1,079	1,090	1,147	1,042	0,936	1,090	1,106	1,066	1,113
Média	1,051	1,060	1,040	1,080	1,090	1,151	1,045	0,938	1,092	1,109	1,069	1,114
DP	0,008	0,006	0,006	0,026	0,035	0,010	0,006	0,011	0,019	0,015	0,012	0,029
DPR (%)	0,76	0,52	0,53	2,41	3,18	0,89	0,61	1,17	1,77	1,37	1,10	2,57

DP= desvio padrão;

DPR= desvio padrão relativo

8.4.2.5.3 Exatidão

A exatidão do método é expressa em termos de percentagem de recuperação e definida como a quantidade de substância de interesse presente ou adicionada na amostra, passível de extração e quantificação. A exatidão pode ser avaliada referente a adição de substância padrão de referência ou do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004; ERMER e MILLER, 2005).

Na tabela 93, constam os dados obtidos por CLAE para os testes de recuperação expressos em termos de percentagem de recuperação

Tabela 93: Recuperação das soluções padrão dos marcadores de *P. ovata* adicionadas às amostras e analisadas pelo método proposto (n=3)

Marcador	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	DPR (%)	% recuperação
Ramnose	0,5000	0,4875	2,50	97,50
	1,0000	1,0456	4,56	104,56
	5,0000	4,9850	0,30	99,70
Ácido ursólico	0,5000	0,5121	2,40	102,40
	1,0000	0,9975	0,25	99,75
	5,0000	5,0367	0,73	100,73
Ácido Oleanólico	0,5000	0,5025	0,50	100,50
	1,0000	1,0013	0,13	100,13
	5,0000	4,9940	0,12	99,88
Ácido galacturônico	0,5000	0,4978	0,45	99,55
	1,0000	1,0031	0,31	100,31
	5,0000	4,9727	0,55	99,45
Arabinose	0,5000	0,4930	1,40	98,60
	1,0000	1,0050	0,50	100,50
	5,0000	4,9513	0,97	99,03
Aucubina	0,5000	0,4903	1,95	98,05
	1,0000	1,0253	2,53	102,53
	5,0000	4,9682	0,64	99,36

Observou-se neste estudo, que a recuperação para os padrões de interesse, foi na faixa de 97,50 a 104,56%. Os resultados se encontram dentro da faixa aceitável de recuperação, porém porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% é o desejável, mas, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata conforme a RE 899, 2003.

Para trabalhos que utilizaram extrato seco de *Passiflora incarnata* L., a média das recuperações da exatidão foi de 97,83% dentro da faixa aceitável de recuperação (ZILIOTTO *et al.*, 2012). Entretanto, Chabariberi (2009) mostrou que os flavonoides de *P. incarnata* L. e Passifloraceae, por espectrometria UV-Visível, tiveram valores de recuperação entre 70 e 120%, encontrando-se aceitáveis segundo os limites propostos (ICH, 1995).

Na validação de um método por Cromatografia Líquida para quantificar antocianinas em morango (*Fragaria* spp.), foram obtidas recuperações de 83 a 99%. Esses valores são considerados aceitáveis para a matriz estudada, devido à sua complexidade, segundo a AOAC (80-120% para alimentos) (AOAC, 2012).

Recuperações de 98-100% foram obtidas para flavan-3-óis, e ácidos hidroxibenzoicos hidroxicinâmicos, dihidrocalcones, flavonóis e flavonas, ao passo que as recuperações menores de 83% foram observadas para as flavanonas, o que foi atribuído às suas estruturas polares de baixo peso molecular. Estas substâncias menos polares tendem a ser mais solúveis em solventes não aquosos. Contudo, o método foi adequado para todas as classes de fenólicos presentes em frutas, exceto para flavanonas, baseada na Cromatografia Líquida para a determinação simultânea de várias famílias polifenólicas em sucos de frutas (ABAD-GARCÍA *et al.*, 2007).

Jankovic e colaboradores (2013) avaliando aucubina em diferentes espécies de *plantago*, verificaram que a recuperação da exatidão do método, em triplicata, foi de 96,7-104,5%.

Considerando a ausência de materiais de referência e a falta de métodos oficiais de análise marcadores químicos, a tarefa de medição de recuperação se torna difícil. Da mesma forma, que a extração completa de compostos fenólicos de paredes de células não é fácil e, subsequentemente, não muita informação referente à extração completa de compostos pode ser encontrada na literatura.

9.4.2.5 Linearidade e intervalo de confiança

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado. Sendo este a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (BRASIL, 2003).

A curva de calibração deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear, o coeficiente de correlação e a concentração conhecida do analito. Esta pode ser construída usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido e é usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A suposição clássica da curva de calibração é que a resposta instrumental está linearmente relacionada com a concentração do padrão.

A linearidade é considerada, erroneamente, como apenas um ajuste adequado, fornecido pelo coeficiente de correlação, como ferramenta para avaliação da linearidade no intervalo de concentrações estudado. A revisão de Burke demonstra que apenas um alto valor de r não significa, necessariamente, que a distribuição dos resultados é linear (BURKE, 2001; CROWTHER, 2001; LISTER, 2005). Adicionalmente, um dos métodos mais aceitos para a rápida avaliação da distribuição linear dos resultados é o cálculo e construção do gráfico de resíduos (BURKE, 2001).

As curvas analíticas obtidas para os marcadores químicos utilizados para a espécie *P. ovata* foi construída, numa faixa compreendida entre 0,2-100 $\mu\text{g/mL}$ e os dados referentes às médias das triplicatas das curvas padrão estão dispostos nas Tabelas 94.

Tabela 94: Dados obtidos das curvas padrão para os marcadores químicos utilizados em *P. ovata*. Os valores referem-se a média da análise em triplicata.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Aucubina	Ramnose	Ácido ursólico	Ácido oleanólico	Ácido galacturônico	Arabinose
0,2	21649	3388	2734	2651	3842	2556
2	154891	39546	33902	32873	47654	31697
10	618338	155764	133536	159481	187701	114851
25	1690916	350714	366678	355544	515411	319829
50	2865483	646855	755971	699394	767432	600463
100	5450755	1308202	1556103	1487462	1576429	1248574

A curva de calibração e os dados obtidos a partir dela estão mostrados na Figura 160 e Tabela 95, respectivamente

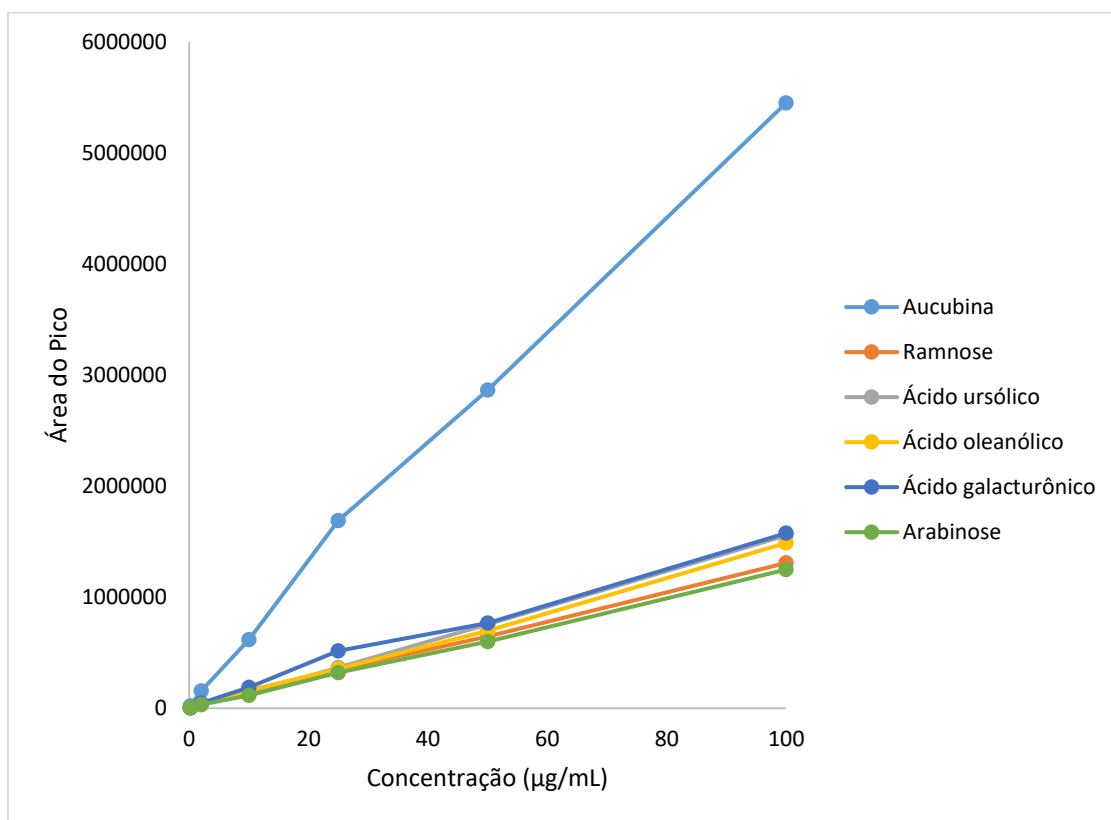


Figura 160: Curva analítica determinada por CLAE dos compostos utilizados como padrões para a espécie *P. ovata*.

Tabela 95: Coeficiente angular, coeficiente linear e correlação obtidos através da regressão de mínimos quadrados para as curvas padrão dos marcadores químicos de *P. ovata*.

Padrão	m	b	r²
Aucubina	113381	218935	0,9968
Ramnose	29694	58734	0,9967
Ácido ursólico	30424	18168	0,9994
Ácido oleanólico	30192	30707	0,9979
Ácido galacturônico	31347	69281	0,9933
Arabinose	20617	44179	0,9950

Observa-se pela Tabela 95 que o coeficiente de correlação de todos os marcadores utilizados foi próximo a 1,0. Dessa forma, verifica-se alta correlação entre a concentração e o pico determinado por CLAE, uma vez que o intervalo estudado se mostrou linear sob a investigação do gráfico de resíduos (Figura 161). Além disso, o teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear realizado pelo Excel. A análise de dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, da mesma forma que não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F crítico no nível de significância de 95%. Portanto, o método analítico desenvolvido possui linearidade entre 0,2 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

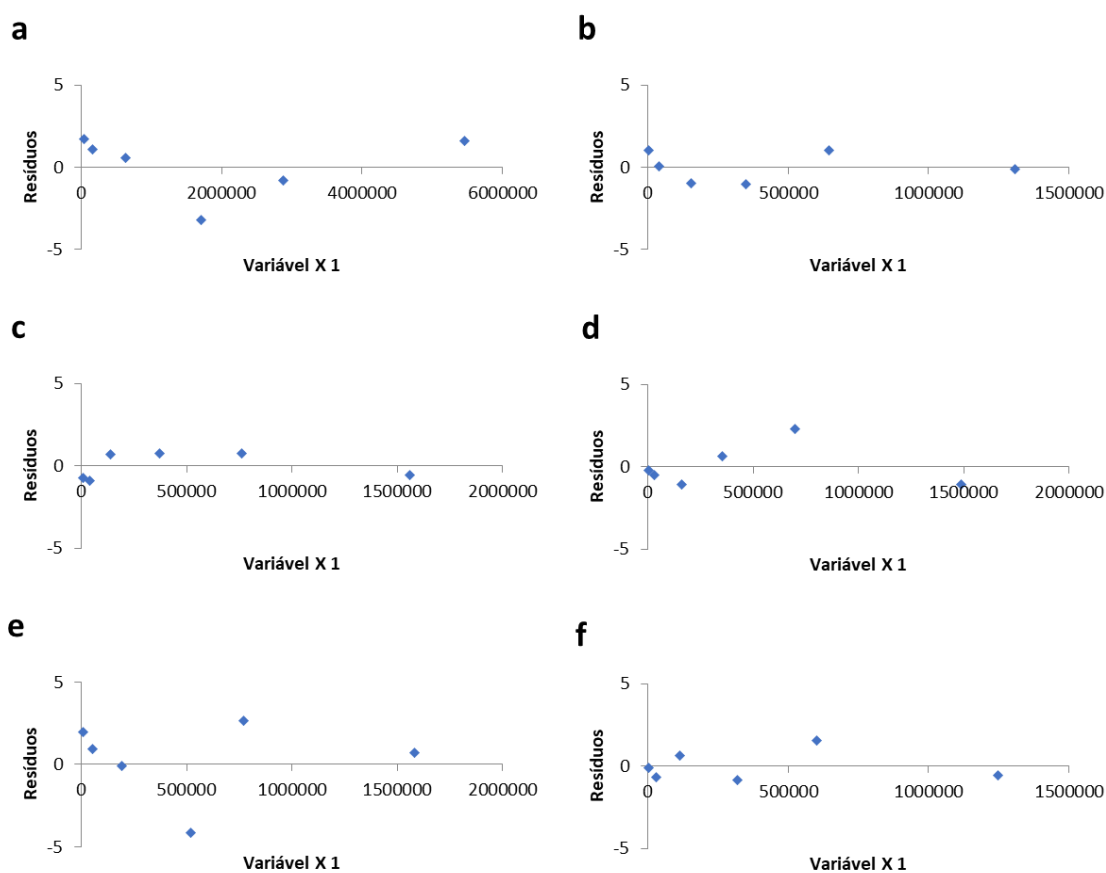


Figura 161: Gráfico de resíduos da linearidade de aucubina (a), ramnose (b), ácido ursólico (c), ácido oleanólico (d), ácido galacturônico (e) e arabinose (f).

9.4.3 Aplicação da metodologia proposta.

A Figura 162 apresenta os resultados obtidos para as análises de *P. ovata* comercializados em feiras livres do estado da Bahia.

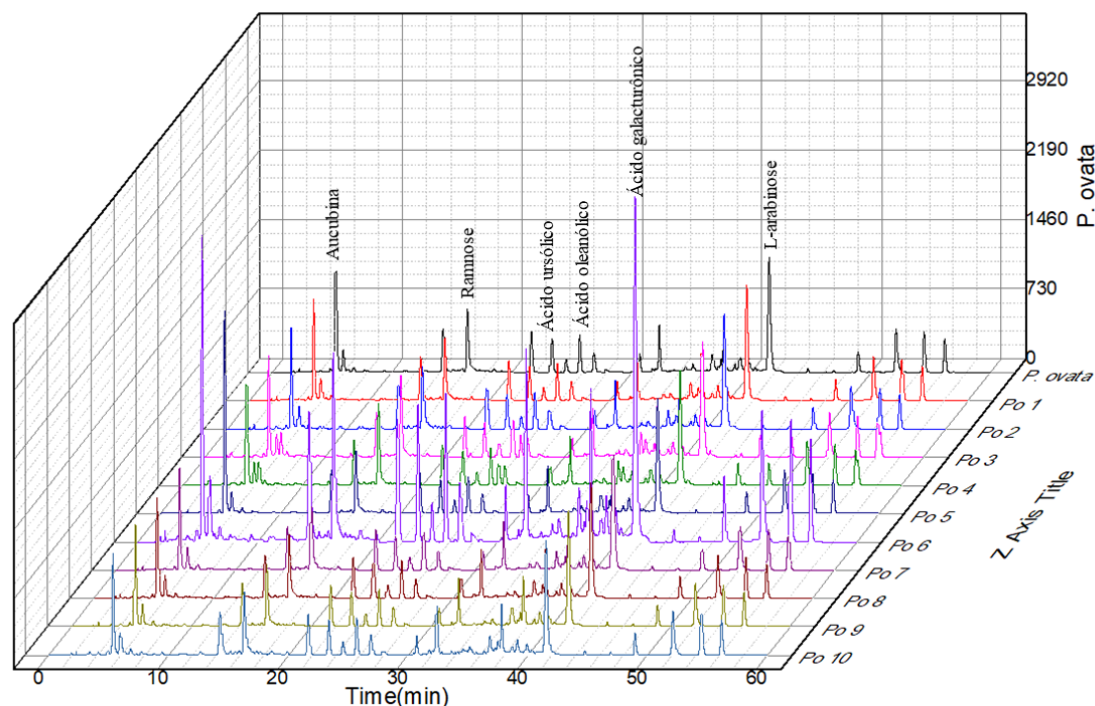


Figura 162: Cromatograma das amostras de *P. ovata* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

A partir da análise da Figura 162, observa-se que há alta correlação entre os cromatogramas analisados. A análise visual revela que os cromatogramas apresentam-se conservados. Todavia, é perceptível que as amostras Po 3 e Po 4 apresentam picos diferentes quando comparados ao padrão. De acordo com ANVISA (2014), as espécies *Plantago psyllium* e *Plantago indica* (*Plantago arenaria*), sementes de outras espécies de *Plantago* podem ser detectadas, como *P. major* L. e *P. media* L., o que foi corroborado por Shahat *et al.* (2012) e Bisset e Wichtl (2011).

Outra discrepância encontrada na Figura 162 diz respeito as amostras Po 5 e Po 6. Tais amostras apresentam concentrações e áreas dos compostos aucubina na amostra Po 5, aucubina, ácido ursólico e oleanólico na amostra Po 6.

Os cromatogramas obtidos na Figura 162 foram utilizados para a determinação da concentração dos marcadores químicos utilizados (Tabela 96). As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente (STANDARD METHODS, 1997).

Tabela 96: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *P. ovata* coletadas no estado da Bahia. *Po* (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso, e das amostras de fitoterápicos analisados.

Amostra	Aucubina		Ramnose		Ácido ursólico		Ácido oleanólico		Ácido galacturônico		Arabinose	
Padrão	0,2750	± 0,0110	0,0480	± 0,0030	2,5010	± 0,0080	0,7312	± 0,0220	0,3600	± 0,0190	0,2640	± 0,0605
Po 1	0,2710	± 0,0450	0,0470	± 0,0070	2,5100	± 0,0380	0,7345	± 0,0900	0,3590	± 0,0830	0,2260	± 0,0985
Po 2	0,2760	± 0,0160	0,0460	± 0,0010	2,4912	± 0,0150	0,7249	± 0,0320	0,3490	± 0,0310	0,2600	± 0,0625
Po 3	0,2700	± 0,0340	0,0500	± 0,0050	2,4958	± 0,0290	0,7215	± 0,0680	0,3780	± 0,0630	0,2360	± 0,0783
Po 4	0,2490	± 0,0060	0,0450	± 0,0100	2,4990	± 0,0150	0,7312	± 0,0310	0,3650	± 0,0305	0,2430	± 0,0400
Po 5	0,3480	± 0,0150	0,0460	± 0,0110	3,0156	± 0,0040	0,7415	± 0,0300	0,3690	± 0,0190	0,2630	± 0,0625
Po 6	0,3590	± 0,0480	0,0450	± 0,0090	3,0325	± 0,0390	0,7495	± 0,0960	0,3590	± 0,0870	0,2680	± 0,0975
Po 7	0,2650	± 0,0150	0,0500	± 0,0090	2,4985	± 0,0060	0,7398	± 0,0300	0,3660	± 0,0210	0,2500	± 0,0535
Po 8	0,2710	± 0,0350	0,0500	± 0,0050	2,5120	± 0,0300	0,7215	± 0,0700	0,3610	± 0,0650	0,2360	± 0,1865
Po 9	0,2940	± 0,1250	0,0460	± 0,0070	2,5310	± 0,1180	0,7366	± 0,2500	0,3940	± 0,2430	0,2590	± 0,2605
Po 10	0,2800	± 0,0180	0,0480	± 0,0010	2,5490	± 0,0170	0,7344	± 0,0360	0,3970	± 0,0350	0,2620	± 0,0430
APo 1	0,2610	± 0,0090	0,0480	± 0,0020	2,5010	± 0,0070	0,7637	± 0,0180	0,3940	± 0,0160	0,2520	± 0,0280
APo 2	0,2710	± 0,0070	0,0480	± 0,0080	2,5000	± 0,0110	0,7345	± 0,0260	0,3660	± 0,0240	0,2440	± 0,0675
APo 3	0,2690	± 0,0450	0,0450	± 0,0030	2,5070	± 0,0420	0,7349	± 0,0900	0,3540	± 0,0870	0,2230	± 0,1045
APo 4	0,2640	± 0,0180	0,0440	± 0,0010	2,4980	± 0,0170	0,7315	± 0,0360	0,3780	± 0,0350	0,2460	± 0,1200
APo 5	0,2750	± 0,0870	0,0430	± 0,0040	2,4770	± 0,0830	0,7311	± 0,1740	0,3120	± 0,1700	0,2570	± 0,1700

Po = *Plantago ovata*

Observa-se que a concentração dos metabólitos se mostrou praticamente sem diferenças significativas entre as amostras analisadas, todavia, algumas amostras apresentaram concentração mais elevada comparada a amostra padrão. As amostras dos fitoterápicos analisadas, mostram-se correlatas com o padrão.

Tamura e Nishibe (2002) avaliaram a quantidade de ácido ursólico e ácido oleanólico de *Plantago* da Nova Zelândia e verificaram que a quantidade desses metabólicos variavam de acordo com a sazonalidade da colheita. Ademais, corroboraram que o bioma exerce forte impacto na concentração dos metabólicos com variação de 2,5 – 9,8 %.

Jurisc e colaboradores (2003) avaliaram a concentração de aucubina em amostras de *Plantago* coletadas na Croácia, através de cromatografia micelar eletrocinética. Os dados apresentados pelos autores refletem a necessidade de verificação, corriqueira, da data de colheita, uma vez que houve variação de 0,15 – 1,81% na quantidade de metabólitos analisados (aucubina) nas amostras.

9.4.4 Espectrofotometria UV-VIS

Os espectros das substâncias utilizadas como marcadores químicos para análise de *P. ovata*, foram obtidos em espectrofotômetro modelo Varian modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa de 200-800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1.0 cm e capacidade de 3 mL

O desenvolvimento de metodologias menos onerosas, mais facilmente executáveis e que normalmente empregam menor aparato instrumental são de grande valia e requerem a realização de estudos de validação destas técnicas para cada espécie e órgão vegetal específico a fim de garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (PELOZO *et al.*, 2008; SILVA-CORAZZA *et al.*, 2010).

Para a quantificação de marcadores pela metodologia UV-vis, utilizou-se a adição de soluções de concentrações conhecidas. Dessa forma, a Figura 163 apresenta a curva analítica obtida por UV-Vis e a Tabela 97 apresenta os valores das curvas analíticas ($y=mx+b$) dos padrões obtidas pelo método de regressão linear.

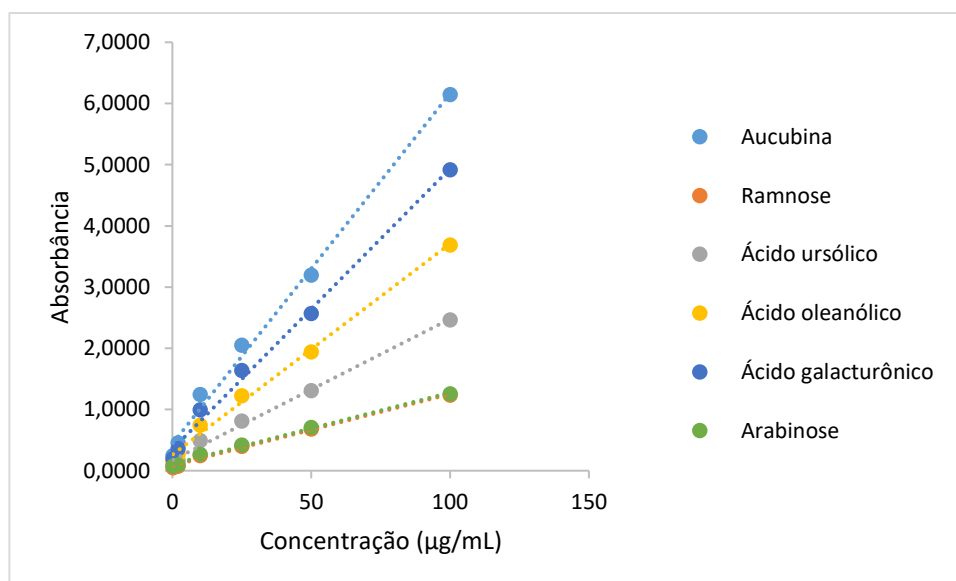


Figura 163: Curva analítica para determinação dos marcadores em amostras de *P. ovata* por UV-vis.

Tabela 97: Valores obtidos das curvas analíticas para análise Aucubina, ramnose, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido galacturônico, arabinose em amostras de *Plantago ovata* por UV-Vis

Padrão	m	b	x
Aucubina	0,0573	0,4384	0,9938
Ramnose	0,0117	0,0826	0,9947
Ácido ursólico	0,0231	0,1715	0,9946
Ácido oleanólico	0,0345	0,2605	0,9942
Ácido galacturônico	0,0459	0,3494	0,9943
Arabinose	0,117	0,1072	0,9947

A curva analítica para a determinação dos compostos por UV-Vis foi obtida através da regressão linear de mínimos quadrados. Tais dados refletem elevada linearidade da análise. Comprovando, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respostas espectrométricas, atendendo os requisitos preconizados para análise desse parâmetro (> 99%) (BRASIL, 2003).

A partir da curva analítica, foi determinada a concentração das substâncias utilizadas como marcadores nas amostras analisadas (Tabela 98)

Tabela 98: Concentração dos marcadores químicos presentes em amostras de *P. ovata* coletadas no estado da Bahia. *Po* (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso e nas amostras de fitoterápicos.

Amostra	Aucubina		Ramnose		Ácido ursólico		Ácido oleanólico		Ácido galacturônico		Arabinose	
Padrão	0,2740 ±	0,0110	0,0458 ±	0,0070	2,7430 ±	0,0411	0,7920 ±	0,0310	0,3640 ±	0,1320	0,2501 ±	0,0555
Po 1	0,2360 ±	0,0450	0,0452 ±	0,0260	2,3670 ±	0,0790	0,6780 ±	0,1110	0,3260 ±	0,0360	0,2510 ±	0,0050
Po 2	0,2700 ±	0,0160	0,0460 ±	0,0085	2,7010 ±	0,0391	0,7800 ±	0,0350	0,3600 ±	0,1420	0,2491 ±	0,0415
Po 3	0,2460 ±	0,0340	0,0450 ±	0,0195	2,4650 ±	0,0778	0,7080 ±	0,0830	0,3360 ±	0,0490	0,2496 ±	0,0030
Po 4	0,2530 ±	0,0250	0,0415 ±	0,0175	2,5400 ±	0,0645	0,7290 ±	0,0515	0,3430 ±	0,1070	0,2499 ±	0,0293
Po 5	0,3540 ±	0,0150	0,0580 ±	0,0130	3,5510 ±	0,0723	0,7890 ±	0,0630	0,3630 ±	0,0470	0,3016 ±	0,0115
Po 6	0,3710 ±	0,0480	0,0598 ±	0,0285	3,7190 ±	0,0631	0,8040 ±	0,1230	0,3680 ±	0,0560	0,3033 ±	0,0700
Po 7	0,2600 ±	0,0150	0,0442 ±	0,0120	2,6090 ±	0,0579	0,7500 ±	0,0570	0,3500 ±	0,1530	0,2499 ±	0,0005
Po 8	0,2460 ±	0,0350	0,0452 ±	0,0200	2,4650 ±	0,0701	0,7080 ±	0,0850	0,3360 ±	0,0540	0,2512 ±	0,1805
Po 9	0,2690 ±	0,1250	0,0490 ±	0,0660	2,6970 ±	0,0646	0,7770 ±	0,2710	0,3590 ±	0,1100	0,2531 ±	0,1290
Po 10	0,2720 ±	0,0180	0,0467 ±	0,0095	2,7210 ±	0,0640	0,7860 ±	0,0390	0,3620 ±	0,3820	0,2549 ±	0,0410
APo 1	0,2620 ±	0,0090	0,0435 ±	0,0055	2,6220 ±	0,0701	0,7560 ±	0,0240	0,3520 ±	0,0550	0,2501 ±	0,0040
APo 2	0,2540 ±	0,0190	0,0418 ±	0,0135	2,5480 ±	0,0640	0,7320 ±	0,0440	0,3440 ±	0,0290	0,2500 ±	0,0810
APo 3	0,2330 ±	0,0450	0,0440 ±	0,0240	2,3330 ±	0,0794	0,6690 ±	0,0990	0,3230 ±	0,0410	0,2507 ±	0,0450
APo 4	0,2560 ±	0,0180	0,0440 ±	0,0095	2,5610 ±	0,0679	0,7380 ±	0,0390	0,3460 ±	0,1380	0,2498 ±	0,0140
APo 5	0,2670 ±	0,0870	0,0392 ±	0,0455	2,6740 ±	0,0229	0,7710 ±	0,1860	0,3570 ±	0,0550	0,2477 ±	0,1090

A análise da Tabela 98 demonstra que a metodologia é de grande valia para a quantificação dos marcadores químicos nas amostras estudadas, estando de acordo ao esperado. Ademais, as amostras apresentam elevada correlação em relação a concentração dos marcadores quando comparado a metodologia por HPLC-DAD.

9.4.5 Análises estatísticas

Durante o desenvolvimento de uma metodologia, a validação da mesma se dá por comparação à outra metodologia. Dessa forma, a comparação entre os métodos, HPLC e UV-Vis, foi avaliado quanto a correlação (ANOVA) entre os dois métodos, teste t, HCA e PCA. Além disso, foi utilizado a análise por HCA e PCA para avaliação e comparação das amostras comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

9.4.5.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A análise de similaridade (HCA) é um modelo confiável para avaliar a impressão digital cromatográfica (*fingerprint*) de várias fontes com base no cálculo dos coeficientes correlativos dos dados originais. Os coeficientes de correlação de similaridade entre os perfis cromatográficos foram calculados pelo uso do software profissional de análise de cromatograma. Os resultados do HCA são mostrados na Figura 164.

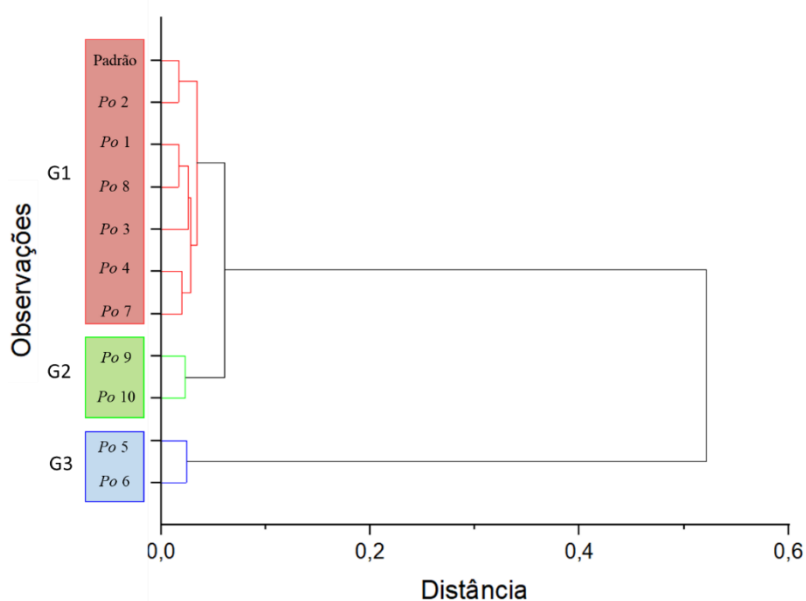


Figura 164 Dendrograma de duas composições químicas para 11 amostras de *P. ovata*. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3.

No dendrograma HCA, a menor distância entre duas amostras indicou sua maior similaridade e as amostras agrupadas no mesmo grupo foram as mais similares. O grupo 1 composto pelas amostras: padrão, Po 1, Po2, Po 3, Po 4, Po 7 e Po 8, com maior similaridade foram classificados em um aglomerado, da mesma forma que o grupo G2, composto por Po 9 e Po 10. As outras amostras, Po 5 e Po 6, formaram grupos a parte: grupo 3. Dessa forma, podemos inferir que os resultados de agrupamento poderiam ser causados pelas diferenças de origem vegetal, efeito do ambiente, estação de coleta, condições de armazenamento das amostras, etc.

9.4.5.2 Análise de dos componentes principais (PCA)

Para avaliar o teor dos elementos em estudo, a distribuição dos mesmos nas matrizes analisadas, dentre outros aspectos, realizou-se a análise de componentes principais utilizando o programa Origin.

Para a escolha das componentes principais que serão utilizadas no estudo é necessário a avaliação prévia dos autovalores de cada componente principal formada. Admite-se autovalores superiores a 1 como sendo aceitáveis para discriminação da variância dos resultados (MINGOTTI, 2007).

De acordo com a Tabela 99, observa-se que somente duas componentes principais formada PC1 (56,46 %) e PC2 (18,18%) apresenta autovalor igual ou superior a 1. Essas componentes juntas permitem explicar 74,64 % da variância total dos resultados, sendo então utilizada para análise das amostra em questão.

Tabela 99: Autovalores e percentual de variância cumulativo.

CP	Autovalor	% Variância	% Variância cumulativa
1	3,38731	56.46%	56.46%
2	1,09098	18.18%	74.64%
3	0,67091	11.18%	85.82%
4	0,49621	8.27%	94.09%
5	0,32425	5.40%	99.49%
6	0,03034	0.51%	100.00%

A Tabela 100 abaixo permite avaliar os pesos das variáveis em relação às componentes principais formadas, uma vez que o total de fatores corresponde ao número de variáveis. Essa tabela permite identificar as variáveis que mais representam a variância dos resultados em cada fator criado.

Tabela 100: Relação entre as variáveis e as componentes principais formadas.

	PC1	PC2
Aucubina	0,50313	-0,01573
Ramnose	-0,36082	0,22116
Ácido ursólico	0,49731	-0,11459
Ácido oleanólico	0,46087	0,09307
Ácido galacturônico	-0,00161	0,92793
Arabinose	0,39617	0,26075

A partir da análise da Tabela 100, verifica-se que os maiores pesos são observados para as variáveis aucubina e ácido ursólico, na primeira componente principal, responsáveis por explicar a maior variância dos resultados nesse fator. Já a variável ácido galacturônico apresenta maior peso em PC2.

9.4.5.2.1 Análise de PC1 x PC2

Obteve-se os gráficos de pesos (Figura 165) e escores (Figura 166) para a análise de PC1 x PC2. As variáveis responsáveis pela separação das análises na PC1 são aucubina, ácido ursólico, ácido oleanólico e arabinose que apresentam valores positivos.. Através da componente principal 2, é possível separar os analitos ácido oleanólico, ácido galacturônico, ramnose e arabinose dos demais. Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, nota-se a formação de três grandes grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pela amostra amostras: padrão, Po 1, Po2, Po 3,. Po 4, Po 7 e Po 8, um segundo grupo, central acima, composto pelas amostras Po 9 e Po 10 e um terceiro grupo, à direita, formado pelas amostras Po 5 e Po 6.

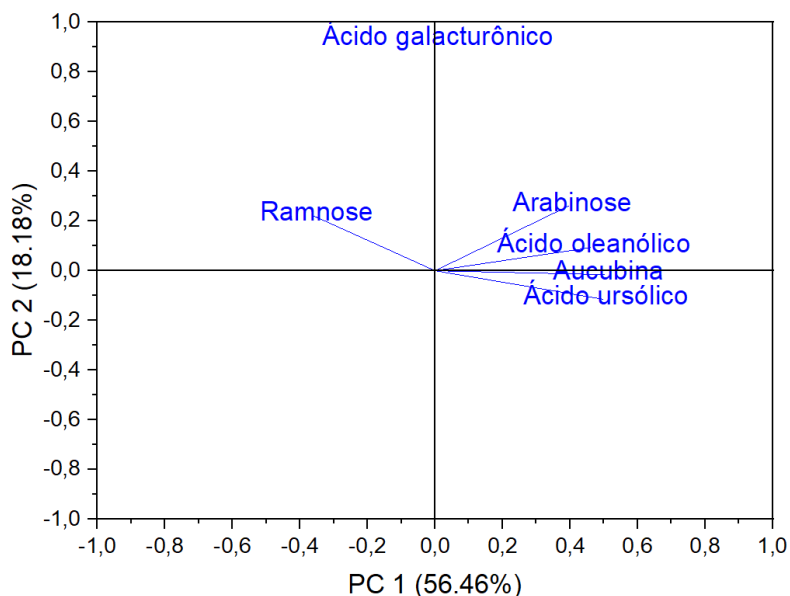


Figura 165: Gráfico de pesos PC1 x PC2.

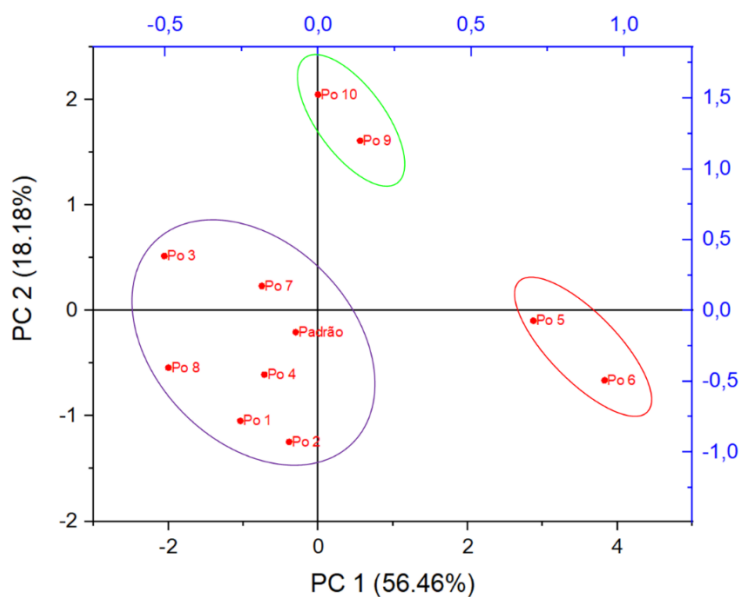


Figura 166: Gráfico de escores PC1 x PC2.

Conforme evidenciado na Figura 166, de acordo com PC1, o grupo formado pelas amostras Po 9 e Po 10 apresenta concentração maior do marcador ácido galacturônico e as amostras Po5 e Po 6 apresentam concentrações mais elevadas dos marcadores aucubina, ácido ursólico, ácido oleanólico e arabinose. Da mesma forma, de acordo com a PC2, as amostras Po 10 e Po 9 apresentam concentração de ácido galacturônico mais elevada com relação as demais amostras. As amostras ao centro do gráfico de escores,

ainda na Figura 166, o grupo formado pelas demais amostras – com exceção das mencionadas - exibe menor teor de todos os elementos químicos determinados, porém mais próximas à amostra padrão. Ademais, as amostras Po 3 e Po 7, possivelmente, possui elevada concentração de Ramnose.

9.4.5.2 Análise de PCA tridimensional

Além da análise clássica da PCA, é possível a plotagem de gráfico usando três componentes principais e assim possibilitar uma visão tridimensional da dispersão dos pontos, conforme Figura 167. O *software* utilizado permite a plotagem tridimensional e também possibilita a rotação do conjunto de dados do gráfico, sendo possível visualizar a distribuição dos pontos sob diversos ângulos, tornando possível observar a melhor posição onde os pontos de uma amostra de *Plantago ovata* encontram-se separados dos pontos de outra amostra. Dessa forma, aumentam as possibilidades de encontrar pontos no espaço que nos permitem verificar a correlação ou a discrepância entre as amostras analisadas.

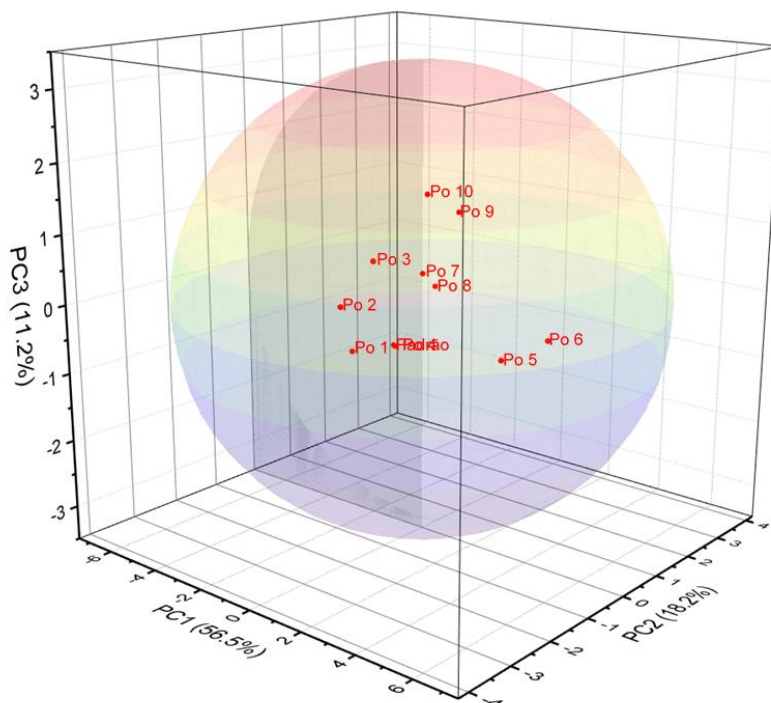


Figura 167: PCA das amostras de *P. ovata* apresentadas num gráfico tridimensional com a presença de três componentes principais. O círculo central apresenta a confiabilidade de 95%.

9.4.6 Avaliação da metodologia

Os resultados do teste t para as análises realizadas por UV-vis e comparadas com HPLC são apresentados na Tabela 101.

Tabela 101: Teste t pareado para a determinação dos marcadores químicos de *Plantago ovata* por HPLC e por espectrofotometria UV-vis.

	HPLC	UV
Média	0,707425625	0,729642639
Variância	0,749285199	0,85873056
Observações	96	96
Correlação de Pearson	0,804007879	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	190	
Stat t	-0,171662784	
P(T<=t) uni-caudal	0,431942669	
t crítico uni-caudal	1,652912949	
P(T<=t) bi-caudal	0,863885339	
t crítico bi-caudal	1,972528182	

Pode-se observar que em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada. Os resultados do Teste t de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$ (Tabelas 100), demonstraram não haver diferença significativa entre a metodologia proposta em comparação a metodologia por espectrofotometria UV-Vis. Tal fato, o valor de t calculado (0,86) é menor que o valor de t tabelado (1,97).

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a quantificação dos marcadores químicos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 102.

Tabela 102: Análise da variância (ANOVA) das determinações da concentração dos marcadores por HPLC e UV-Vis.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,023693	1	0,023693	0,029468	0,03385*	3,890867
Dentro dos grupos	152,7615	190	0,804008			
Total	152,7852	191				

O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,03385 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. De fato, o valor de F calculado (0,029468) é menor que o valor de F crítico (3,890867). A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabelas 102) demonstrou que não haver diferenças significativas entre as metodologias ($\rho = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias (Figura 168) evidenciam que não há diferenças entre as metodologias, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a metodologia proposta é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *P. ovata*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

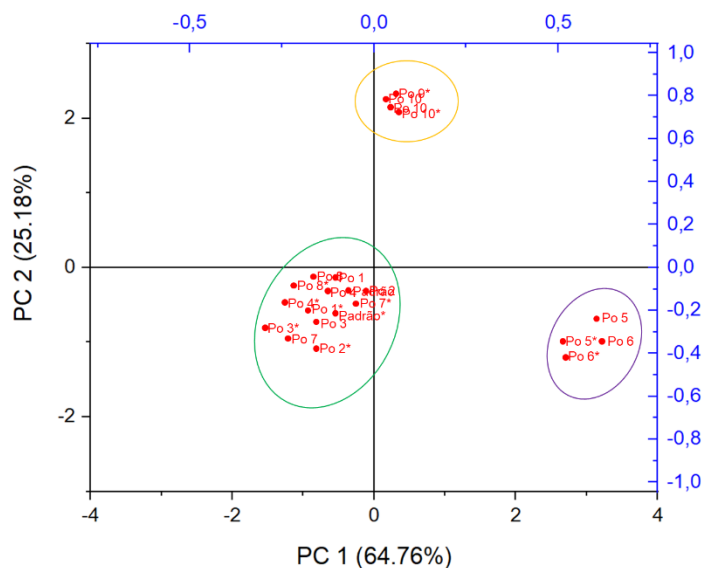


Figura 168: Gráfico de pesos PC1 x PC2 para avaliação da correlação entre análise por HPLC e UV-vis.

Capítulo 10



Fonte: http://back-to-nature.gr/2012/11/blog-post_5217.html

Conclusão

10. Conclusão e Perspectiva Futura

O trabalho realizado permitiu o desenvolvimento e validação de métodos analíticos a partir da caracterização dos principais marcadores das espécies *Schinus terebinthifolius*, *Glycine max*, *Rhamnus purshiana*, *Cassia angustifolia* e *Plantago ovata*, atingindo integralmente aos objetivos estabelecidos.

A necessidade de vigilância contínua em relação à qualidade dos produtos medicinais e fitoterápicos, a qual foi enfatizada ao constatar-se que amostras de algumas plantas analisadas mostraram evidência clara de adulteração. Monografias farmacopéicas para matérias-primas botânicas e formas de dosagem, como as da USP-NF, EP e BP, desempenham um papel essencial na garantia da qualidade de tais produtos. Contudo, os testes atualmente prescritos nestas monografias não fornecem a detecção de adições de adulterantes.

Em relação aos métodos analíticos, foi possível desenvolver e validar metodologias analíticas através da CLAE atendendo aos requisitos de validação exigidos pela ANVISA e pela ICH para o controle de qualidade químico dos extratos e produto fitoterápico. Essas metodologias também foram comparadas quanto à equivalência das mesmas e não apresentaram diferenças significativas em relação à análise quantitativa das amostras analisadas através de análise dos componentes principais (PCA), análise de variância (ANOVA) e teste t.

Além disso, a metodologia possibilitou a verificação da confiabilidade das drogas vegetais estudadas no estado da Bahia. Os testes demonstraram adulteração em algumas espécies vegetais analisadas, bem como a variação dos componentes estudados.

Os resultados do estudo geográfico demonstraram que existe uma variação quali e quantitativa significativa nas classes de metabólitos secundários investigadas. Tais resultados são evidenciados pela diferença de biomas bem como da época de colheita das espécies vegetais. Dessa forma, esse tipo de análise é de suma importância, uma vez que os espécimes estudados estão na lista de plantas medicinais oferecidas pelo SUS e, dessa forma, diferenças nas concentrações dos metabólitos ocasionam alterações na terapia.

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-VIS das amostras de plantas medicinais e fitoterápicos, foi possível observar que com apenas 4 componentes principais foi plausível agrupar amostras com base nas características de variedade e/ou região de produção. Também foi possível identificar através dos *loadings* os

comprimentos de onda responsáveis por esse agrupamento bem como os metabólitos responsáveis por tais agrupamentos.

Através da análise do coeficiente de correlação, do R-quadrado e do coeficiente angular verificou-se que os modelos construídos foram eficientes para realizar as predições das concentrações a partir dos espectros de absorção e cromatogramas, principalmente para as amostras que apresentaram semelhanças identificadas na PCA com aquelas utilizadas na construção dos modelos.

As dificuldades encontradas na predição do teor dos marcadores químicos em algumas das amostras analisadas se devem pelas diferenças observadas entre essas amostras e as matrizes empregadas na construção dos modelos de calibração, o que representa a principal limitação do método. Entretanto, essas dificuldades podem ser resolvidas pela construção dos modelos de calibração com base nas semelhanças observadas pelos grupos de amostras na PCA.

Além desses fatores, pode-se dizer que a impressão digital cromatográfica combinada com modelagem quimiométrica é uma abordagem interessante pois possibilita uma decisão mais objetiva sobre se uma planta regulada está presente em um suplemento alimentar ou não e isso é baseado em impressões digitais obtidas por CLAE, UV ou outra metodologia.

Os resultados alcançados, poderão contribuir para elaboração de um Banco de Perfis (*fingerprint*) químico das plantas do estudo regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil, desta forma, auxiliando no controle de qualidade destas espécies como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos. O Banco de Perfis, também, poderá ser utilizado como mais uma ferramenta, auxiliando na prevenção da biopirataria destas plantas medicinais. Além disso, este projeto poderá servir de base para futuros trabalhos nesta área com as outras plantas medicinais regulamentadas.



Fonte: <https://uicpermaculture.wordpress.com/permaculture-plants/nutritious-and-delicious-turmeric-the-wonder-plant/>

Referências

11. REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; LÓPEZ-MÁRQUEZ, M.; CRESPO-FERRER, B.; VICENTE, G. F. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1, p. 87-96, 2007/06/22/ 2007.
- ABDEL-ZAHER, A. O.; SALIM, S. Y.; ASSAF, M. H.; ABDEL-HADY, R. H. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina* - Christi leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 101, p. 129–138, 2005.
- ABMBN, **Associação Brasileira de Medicina Biomolecular e Nutrigenômica, Genisteína e Câncer**, Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/>
Acesso em: 31 junho 2018.
- ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T. Urinary excretion of lignans and isoflavone phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 54, p. 1093-1100, 1991
- AKTAR, W.; POI, R.; BHATTACHARYYA, A. Status of senosides conten in various Indian herbal formulations: Method standardization by HPTLC. **Bangladesh J. Pharmacol.** v.3, p.64-68, 2008
- ALBACH, D. C.; MEUDT, H. M.; EXELMAN, B. Piecing together the “new” Plantaginaceae. **Am J Bot.** 92(2):297-315, 2005.
- ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**. Buenos Aires: ISIS Ediciones, p.888, 1998.
- ALVES, F. N. R. Desafio para a inovação em Fitomedicamentos no Contexto da Indústria Farmacêutica Nacional. **Revista Fitos**, 1: 18-29, 2005.
- AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, A.; YOSHIMURA, M.; YOSHIDA, T. Isolation and characterization of phenolic antioxidants from *Plantago* herb. *Molecules*. 2012;17(5):5459-66.
- AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/ Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13(1): 27-30, 2003.
- AMMAR, R. B. NEFFATI, A.; SKANDRANI, I.; SGHAIER, M. B.; BHOURI, W.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from (Tunisian)

- Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). **Natural Product Research**. V. 25 (11), p. 1047–1058, 2011.
- AMMAR, R. B. SGHAIER, M. B.; BOUBAKER, J.; BHOURI, W.; NAFFETI, A.; SKANDRANI, I.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. **Chemico-Biological Interactions**. V.174, p.1–10, 2008.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio clínico randomizado. **Rev Bras Ginecol. Obstet.**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- ANDRADE, L. S.; LAURINDO, E. A.; OLIVEIRA, R. V.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, Q. B. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photoelectrochemical treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol.17 no.2 São Paulo, Mar./Apr. 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 232-240, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 232-240, 2007.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa.gov.br [página inicial na Internet] .Resolução - RE n 899 de 2003 [atualização 2002]. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm .
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 29/05/2003. **Regulamento que estabelece guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: Diário Oficial da União, 02 de fevereiro de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acessado em 10/09/2017.
- ANVISA - Resolução RE n. 899: **Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, (indicado para determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos)**, 2003.
- AOAC INTERNATIONAL **Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces**. Disponível em: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC

- _Validation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf Acesso em 02/junho de 2018.
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. **Bot J Linn Soc.** 2016:1-20.
- ARAÚJO, A. L. A.; OHARA, M. T. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras de São Paulo e de infusos derivados. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 36, n. 1, p. 129-136, 2000.
- ARAÚJO, E. L. A. **Estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.
- ARAÚJO, T. S.; BRITO, C. R.; AGUIAR, M. C. R. D.; CARVALHO, M. C. R. D. Perfil sócio-econômico dos raizeiros que atuam na cidade de Natal (RN). **Infarma**, v.15, n. 1/3, p. 77-79, 2003.
- AUTERHOFF, H.; KINSKY, G. Die Wertbestimmung von Sennesblättern. **Arch. Pharm.** V.298, p.810, (1965).
- AYERS, S. ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUS, S.; STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Scutiaquinones A and B, Perylenequinones from the Roots of *Scutia myrtina* with Anthelmintic Activity. **Journal of Natural Products**. V. 70, p. 425-427, 2007
- BACCAN, N.; ANDRADE, J. C. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3 ed. Edgard Blucher, 2001.
- BACHAYA, H. A.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; SINDHU, Z. U.; JABBAR, A. Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid nematodes* of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 123, p. 325–329, 2009.
- BAGGIO, A. J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo: EMBRAPA Floresta, n. 17, p. 25-32, 1988.
- BARBOSA, M. C. S.; BELLETTI, K. M. S.; CORRÊA, T. F.; SANTOS, C. A. M. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) comercializadas em Curitiba, PR. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 11(1): 1-4, 2001.
- BARCELO. D. **Journal of Chromatography Library**. Elsevier. Amsterdam, 1996.

- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILIPSON, J. D. **Fitoterápicos**. Porto Alegre: Artmed; 2012. 720 p.
- BARROS, S. V. S.; NASCIMENTO, C. C.; AZEVEDO, C. P. Caracterização tecnológica da madeira de três espécies florestais cultivadas no Amazonas: alternativa para produção de lenha. **Floresta**, v. 42, n. 4, p. 725–732, 2012
- BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies, **Phytomedicine**, 2: 193-198, 1996.
- BEEBE, K.; SCASCHOLTZ, R. P. M. B. **Chemometrics: a Practical Guide**. New York, John Wiley & Sons Ltda, 1998.
- BELLO, C. M.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12(2): 75-83, 2002.
- BELTRAME, F. L.; FILHO, E. R.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, 1119: 257-263, 2006.
- BERRY, M. J. A.; LINFO, G. **Mastering data mining**. New York: John Wiley, 2000. 342 p.
- BHOURI, W.; BOUHLEL, I.; BOUBAKER, J.; KILANI, S.; GHEDIRA, K.; GHEDIRA, L. C. Induction of apoptosis in human lymphoblastoid cells by kaempferol 3-O-b-isorhamnoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamnoside from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). **Cell Proliferation**. V.44, p. 283–290, 2011.
- BOLIGON, A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**. V.100, p. 6592–6598, 2009.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, p. 1-6, 1981.
- BORGES, W. N. **Aplicação de métodos de Reconhecimento de Padrões para classificação de Óleos Vegetais**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2001.
- BORGI, W.; GHEDIRA, K.; CHOUCANE, N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. **Fitoterapia**. V. 78, p.16–19, 2007.

- BORNHAUSEN, R. L. **As Ervas do Sítio**. 12. ed. São Paulo: Ed. Bai, 2009.
- BORNTRÄGER, H. Schneller Nachweis der Aloë in Elixiren, Liqueuren und im Bier. **Zeitschrift für Analytische Chemie**. Fresenius Zeitschr. v.19(1), p. 165-167, 1880.
- BOROS, L. F. **Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira)**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *IHERINGIA, Sér. Bot.*, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.
- BOTTOLI, C. B. G.; CHAUDHRY, Z. F.; FONSECA, D. A.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for High-performance Liquid Chromatography. **Journal Chromatography A**, 948: 121, 2002.
- BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Chemical variation within and between individuals of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) **J. Chem. Ecol.**;18:985–995, 1992. doi: 10.1007/BF00980057
- BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECZKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. de. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v, 21, supl. 2, p. 17-22, 2006.
- BRANDÃO, M. G. L. Recomendações para a avaliação da qualidade de drogas e extratos vegetais pelas farmácias de manipulação. **Rev. Infarma** 1997; 6(1/2):6-9.
- BRANDÃO, M. G. L.; ALVES, R. M. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M. T.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 5(1):56-59, 2002.
- BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; SOARES, C. D. V. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, 14(3): 613-616, 1998.
- BRASIL. **Congresso Nacional**. Lei nº. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Diário Oficial da União, Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução Nº 338, de 06 de maio de 2004. Diário Oficial da União, 2004. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2004/res0338_06_05_2004.html

- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010b. 546p., 1v/il. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/index.htm>.
- BRASIL. **Lei das Diretrizes e Bases da Educação**, Lei 9394 de 20 de dezembro de 1996. Brasília, Câmara dos Deputados; Centro de Documentação e Informação, 1996a. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9394.htm.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília; Ministério da Saúde; 148p, 2006a. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no 14 de 31 de março de 2010. **Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no 14 de 31 de março de 2010. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, Série C. Projetos, Programas e Relatórios, 1ª ed., 136p, 2006b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006c.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Resolução nº 196 de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, 201, seção 1: 21082-5 1996b. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/legislacao/1996/51388/resolu_o_196_96_cn_s_26201.pdf.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS (RENISUS)**. Brasília, 2008a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME** – 8. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 200 p
- BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, Série B. Textos Básicos de Saúde, 1ª ed., 60p, 2009. BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa nº 5 de 31 de março de 2010. Diário Oficial da União, p.91, seção 1 nº 63, 2010a. Acesso em: 07/02/2016. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/instrucao05_31_03_10.pdf.
- BRENDEL, W. D.; BERGER, L. Wertbestimmung von folia – und fructus sennae sowie deren zubereitungen. **Planta Med.** v.25(4), p.124-127, 1974.
- BRENDEL, W. D.; SCHNEIDER, D. Wertbestimmung von folia und fructus sennae sowie deren zubereitungen. **Planta Med.** v.25(1), p.63-67, 1974.
- BRUNETON, J. **Elementos de fotoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 2001.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy & phytochemistry medicinal plants. Techniques & documentation**, vol 81, 2nd edn. Lavoisier Publishers, Paris, pp 106–109, 1999.
- BURKE, S. Regression and calibration. **Statistics and data analysis**, LC•GC Europe Online Supplement, 13-18, 2001.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **Int J Food Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33(2) 179-189, 2000.

- CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Orgânica Moderna**, Yunes, R. A. e Calixto, J. B. eds. p. 297-316. Argos Editora. Santa Catarina, 2001.
- CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E. BANDONI, A.L. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 22(3): 265-278, 2003.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BILFUCOT, V. C, MASCOLO, N. Phytoterapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia** 2000; 71:58 -65.
- CARDOSO, N. Q. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Lafoensia pacari* A. St. - Hill (Lythraceae)**. Dissertação de Mestrado - Goiânia – GO, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 93 p, 2013.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Efeitos da genética e do meio ambiente no teor de isoflavonas da soja de diferentes regiões do Brasil. **Pesq. agropec. bras.** vol.34 no.10, 1999.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2009.
- CARVALHO, A. C. B.; FERNÁNDEZ, M. G.; SANTOS, E. J. V.; MELO, A. F. M.; MEDEIROS, I. A.; DINIZ, M. F. F. M. Avaliação legal da propaganda e publicidade de medicamentos fitoterápicos anunciados na Paraíba (Brasil). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 23(3): 413-417, 2004.
- CARVALHO, C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais: **Brasília Med**, 47(2):219-37, 2010.
- CARVALHO, J. C.; ALMANÇA, C. J. **Formulação de Prescrição Fitoterápica** - São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- CARVALHO, J. T.; ALMANÇA, C. C. J. **Formulário de Prescrição Fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2003
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: Edufscar, 2001.
- CENTRAX BULAS. Disponível em: www.bulas.med.br/index.pl?act=search&q=Sene. Acesso em 12 de outubro de 2017.
- CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus*

- (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19 (4): 860 – 864, 2009.
- CHAU, F. T.; SHIH, T. M.; GAO, J. B.; CHAN, C. K. Application of the Fast Wavelet Transform Method to Compress Ultraviolet-Visible Spectra. **Appl. Spectrosc.** 50 (1996) 339.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias, Bioquímica, Propriedades Funcionales e Valores Nutritivos, Modificaciones Químicas**. Editorial Acribia S. A., 1989, p. 257.
- CHEN, Y.; ZHU, S.; XIE, M.; NIE, S.; LIU, W.; LI, C.; GONG, X.; WANG, Y. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. **Anal Chim Acta**. 15;623(2):146-56. doi: 10.1016/j.aca.2008.06.018. Epub 2008.
- CHEN, Y.; ZHU, S.; XIE, M.; NIE, S.; LIU, W.; LI, C.; GONG, X.; WANG, Y. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* Gomes, S. V. F. 2009 130 based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. **Analytica Chimica Acta**, 623: 146-156, 2008.
- CHERNOVIZ, P. L. N. **A Grande Farmacopeia Brasileira - Formulário e Guia Médico. Vol II** (reedição 1841), ed. Itatiaia, Rio de Janeiro, 1996, p. 335-338.
- CHIANG, H. M.; LIN, Y. T.; HSIAO, P. L.; SU, Y. H.; TSAO, H. T.; WEN, K. C. Determination of Marked Components-aloin and aloe-emodin-in *Aloe vera* before and after hydrolysis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 3, p. 646-652, 2012.
- CHIANG, L-C.; NG, L. T.; CHIANG, W.; CHANG, M-Y.; LIN, C-C. Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds of *Plantago* Species. **Planta Med.** 69:600-604. 2003.
- CHIAROTTI, M., MARSILI, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of residual solvent trapped into illicit cocaine exhibits using head-space solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life**, 772(2):249-256, 2002.
- CHRIST, VON B.; PÖPPINGHAUS, T.; WIRTZ-PEITZ, F. Isolierung und strukturaufklärung eines neuen Sennosids aus *Cassia senna* L. **Arzneim.-Forsch.** v.28 (1), p. 225-231, 1978

- CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, 24: 374-380, 2001.
- CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia Líquido de alto desempenho: HPLC**, São Paulo: Edgard Blucher, 2003.
- CISOJA, CENTRO DE INTELIGÊNCIA DA SOJA. **Utilização do grão de soja**. 2006. Disponível em: www.cisoja.com.br, Acesso em: 15 julho 2018.
- CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.
- COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemical in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; PIERINA, S. B. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da UNICAMP, 2006.
- CONTIN, D. R. **Alterações anatômicas e fisiológicas em plantas de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker, sob diferentes condições luminosas e nutricionais** [Dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2009.
- CORDELLA, C. B. Y. **PCA: The Basic Building Block of Chemometrics, Analytical Chemistry**, InTech, Chapter 1, pp. 3-35, 2012.
- CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1926, v. 1-6.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, Curitiba, v. 29, n. 6, 2006.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4ª ed., Lisboa, Portugal. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 248-259, 1994.
- COUTO, A. M.; PROTÁSIO, T. P.; TRUGILHO, P. F.; NEVES, T. A.; SÁ, V. A. Análise multivariada aplicada à avaliação de clones de *Eucalyptus* para a produção de bioenergia. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 525-533, 2013c.

- CRMESC – Conselho Regional de Medicina do Estado de Santa Catarina. Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999. **Guia para validação de métodos analíticos**. Anexo III. Disponível em <http://www.portalmedico.org.br/regional/crmesc/legislacao/gf99391a3.htm>. Acesso em: 10/07/2018.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2.ed. New York: The New York Botanical Garden;1988.
- CROWTHER, J. B. Validation of pharmaceutical test methods. **Separation Science and technology**, 3, 415-443, 2001.
- CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 3 ed., 2010
- CUNHA, A. P. **Plantas medicinais da farmacopeia portuguesa**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.
- CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Química Nova*, 20 (2): 219 – 225, 1997.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14(2):400-9, 2012.
- DARROW, K.; BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) **Biochem. Sys. Ecol.**, 25:1–11, 1997. doi: 10.1016/S0305-1978(96)00090-7.
- DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, 7: 21-25, 1998.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec.**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005. c
- DEMIREZER, L. O.; KARAHAN, N.; UCAKTURK, E.; KURUUZUM-UZ, A.; GUVENALP, Z.; KAZAZ, C. HPLC Fingerprinting of Sennosides in Laxative Drugs with Isolation of Standard Substances from Some Senna Leaves, **Rec. Nat. Prod.** 5:4 (2011) 261-270.
- DEQUEKER, R.; LEMLI, J.; CUVEELE, J. Recherches sur lês drogues a principes anthraquinoniques. **Planta Med.** v.12, p.51-56, 1964.

- DERDE, M. P.; MASSART, D. L. Supervised pattern recognition: the ideal method?. **Analytica Chimica Acta**, 191: 1-16, 1986.
- DERY, O., CORVERA, C. U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N. W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **Am. J. Physiol.** 247, C1429 (1998).
- DEWELL, A.; HOLLENBECK, C. B.; BRUCE, B. The effects of soyderived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic post-menopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 87, p. 118-121, 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2a ed. Chippingham: John Wiley & Sons Ltd; 2001.
- DHANANI, T.; SINGH, R.; REDDY, N.; TRIVEDI, A. e KUMAR, S. Comparison on extraction yield of sennoside A and sennoside B from senna (*Cassia angustifolia*) using conventional and non conventional extraction techniques and their quantification using a validated HPLC-PDA detection method. **Natural Product Research**, VOL. 31, NO. 9, 1097–1101, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1258562>
- DINIZ, L. R. L.; SANTANA, P. C.; RIBEIRO, A. P.; PORTELLA, V. G.; PACHECO, L. F.; MEYER, N. B.; CÉSAR, I. C.; COSENZA, G. P.; BRANDÃO, M. D.; VIEIRA, M. A. Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 123, p. 275–279, 2009.
- DI-STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: UNESP, 2002
- DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002
- DOHME, A. R. L.; ENGELHARDT, H. The chemistry of cascara sagrada. **Journal of the American Chemical Society**; 20(7):534-46. 1898.
- DRESSEN, M.; EYSEN, H.; LEMLI, J. The metabolism of sennoside A and B by the intestinal microflora: in vitro and in vivo studies on the rat and the mouse. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.33, p.679-681, 1981.
- DUAN, B.; HU, J.; HUANG, L.; YANG, X.; CHEN, F. Chemical fingerprint analysis of *Gentianae Radix* et Rhizoma by high-performance liquid chromatography. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2(1): 46-52, 2012.

- DUAN, J. J.; ZHOU, T.; CHEN, X.; WANG, Y.; WEN, Y. G.; XU, F. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil and cyclophosphamide in depression rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 16: 427-436, 2012.
- DUARTE, M. R.; BARDAL, D. Qualidade de amostras de fármacos vegetais comercializados em Curitiba – PR. **Revista Visão Acadêmica**, 3(2): 65-68, 2002.
- DUARTE, M. R.; LIMA, M. P. Análise farmacopéica de amostras de camomila – *Matricaria recutita* L., Asteraceae. **Revista Visão Acadêmica**, 4(2): 89-92, 2003.
- DUARTE, M. R.; SCHRODER, L. M.; TOLEDO, M. G.; YANO, M.; MACHADO, A. A.; MODOLO, A. K. Anatomia foliar comparada de espécies de Aroeira: *Myracrodruon urundeuva* Allemão E *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Visão Acad.**, v. 10, n. 1, p. 18-28, 2009.
- DUARTE, M. R.; TOLEDO, M. G.; OLIVEIRA, R. B. Diagnose morfoanatômica de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão Acadêmica** (Impresso), Curitiba, v. 7, n. 2, p. 1- 14, 2006.
- DUARTE, R. M.; BUDEL, M. J.; RAMOS, M. M. Diagnose anatomica foliar e caulinar de Fruto-de-pombo: *Rhamnus sphaerosperma* Sw. Var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. **Cadernos da Escola de Saúde Farmácia**. V. 1, 2008.
- DUJOURDY, L.; BESACIER, F. Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes. **Forensic Sci. Int.**, 2008, 179, 111-122.
- ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean Isoflavones: effects of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 394-396, 1983.
- EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 12, p. 5265–5270, 2009.
- ELSOHLY, H. N.; DANNER, S.; LI, X. C.; NIMROD, A. C.; CLARK, A. M. New Antimycobacterial Saponin from *Colubrina retusa*. **Journal of Natural Products**. V.62, p. 1341-1342, 1999.
- EMA. European Medicines Agency. **European Union herbal monograph on *Cassia senna* L. and *Cassia angustifolia* vahl, folium**. London: Committee on Herbal Medicinal Products, 26 de outubro de 2006. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018215.pdf. Data de acesso: 28 jun. 2018

- EMBRAPA Soja, disponível em: <<http://www.cnpsoembrapabr>> Acesso em outubro de 2017.
- EMBRAPA, **A Soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producao/soja/SojanoBrasil.htm> . Acesso em: 06 out. 2017.
- ESSEIVA, P.; ANGLADA, F.; DUJOURDY, L.; TARONI, F.; MARGOT, P.; DU PASQUIER, E.; DAWSON, M.; ROUX, C.; DOBLE, P. Chemical profiling and classification of illicit heroin by principal component analysis, calculation of inter sample correlation and artificial neural networks. **Talanta**. 67, 360-367, 2005
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. Strasbourg (França): **Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM)**, 2016.
- EVANS, W. C.; **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.
- FAIRBAIN, J. W.; FRIEDMANN, C. A.; RYAN, A. H. Vegetable purgatives containing anthracene derivatives. Part X. **J. Pharm. Pharmacol.** v.10, Suppl. 186T-192T, 1958.
- FAIRBAIRN, J. W.; MOSS, M. J. R. The relative purgative activities of 1,8-dehydroxyanthracene derivatives. **J. Pharm Pharmacol.** v.22, p.584-593, 1970.
- FAIRBAIRN, J. W.; SALEH, M. R. I. Vegetable purgatives containing anthracene derivatives. Part IV. **J. Pharm. Pharmacol.** v.5, p.317-326, 1953.
- FAIRBAIRN, J. W.; SCHRESTHS, A. B. The distribution of anthraquinone glycosides in Cassia senna L. **Phytochemistry**. v.6, p.1203-1207, 1967.
- FAO. **Validation of analytical methods for food control. A report of a joint FAO / IAEA Expert Consultant**. Rome, FAO, 1998.
- FARIA, S. M.; NÓBREGA, H. N.; FERREIRA, J. A. B.; MARIN, V. A. Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2012; 71(3):549-56.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV Edição. **Fascículo 2**, 2000.
- FARMACOPEIA PORTUGUESA **8ª Edição**. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde, 2005.
- FARNSWORTH, N. R. Testando plantas para novos remédios. In: WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1997. Cap. 9
- FARRAR, Jr. R. R.; SHEPARD, B. M.; SHAPIRO, M.; HASSELL, R. L.; SCHAFFER, M. L.; SMITH, C. M. Supplemental control of lepidopterous pests on Bt transgenic

- sweet corn with biologically-based spray treatments. **Jornal of inset Science**, v. 9, n. 8, p. 1-10, 2009.
- FERRARI, R. A.; DEMIATI, I. M. Isoflavonas de soja- uma breve revisão. **Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences**, 7(1): 39-46, 2001.
- FERREIRA, A. O. **Manipulação de Fitoterápicos**. Anfarmag.
- FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. “Produtos Naturais no Controle de Insetos”. In: FERREIRA, J. T. B. *et al.* (Orgs.). **Série de textos da Escola de Verão em Química**. São Carlos: EDUFSCar, v. 3, 2001. p. 1.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22(5): 724-731, 1999.
- FISCHER, D. C. H.; OHARA, M. T.; SAITO, T. Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 29(2): 81-88, 1993. 2004a.
- FISCHER, H. M.; NANXIONG, Y.; RALPH, R. G. J.; ANDERSON, L.; MARLETTA, J. A. The gel forming polysaccharide of *psyllium husk* (*P. ovate* Forsk). **Carbohydr Res** 339:2009–2017, 2004b.
- FLEER, H.; VERSPOHL, E. J. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, 14(6), 409–15, 2007.
- FONT, G.; MANES, J.; MOLTÓ, J. C.; PICÓ, Y. Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. **Journal of Chromatography A**, 642: 135-161, 1993.
- FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos. Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 36- 40, 1999.
- FRIEDRICH, H.; BAIER, S. Untersuchungen über die inhaltsstoffe der sennesblätter. **Planta Med.** v.23, p.74-87, 1973.
- FRITZ, J. S.; MACKA, M.; Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, 642: 137-166, 2000.
- GACHET, M. S.; LECARO, J. S.; KAISER. M.; BRUN. R.; NAVARRETE, H.; MUÑOZ, R, A.; BAUER, R.; SCHÜHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**. V.128, p.184–197, 2010.

- GALDINO, V. S. **Das plantas medicinais e a biopirataria**. Disponível em: http://www.publicadireito.com.br/conpedi/manaus/arquivos/anais/manaus/direito_ambiental_valeria_silva_galdino.pdf. Acesso em 02/07/2018.
- GAN, F.; YE, R. New approach on similarity of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, 1104: 100- 105, 2006.
- GAO, Q.; CHOU, G.; DONG, T. T.; LI, J.; DUAN, R.; CHEUNG, W.; TSIM, K. W. Identification and quality control of radix et rhizoma gentianae by chemical fingerprinting: evaluation of gentiopicrotin from different cultivated regions in China. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v.1, p. 3-4, 2006.
- GARRATT, D. C.; DAGLISH, C.; EDMOND, J. D.; FAIRBAIRN, J. W.; JOLLY, S. C.; LINLEY, P. A. The chemical assay of cascara dry extract, cascara tablets and cascara bark. **The Analyst**. 98:830-7, 1973.
- GEHRKE, I. T. S.; STOLZ, E. D.; MOREL, A. F. **Identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* da região noroeste do RS**. In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007.
- GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy Part. I. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta B**, 58: 767-782, 2003.
- GENOTYPES, W. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 279–286, 2006.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavanonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21(1): 86-93, 2001.
- GIACOMELLI, S. R.; MALDANER, G.; GONZAGA, W. A.; GARCIA, C. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria americana*. **Phytochemistry**. V. 65, p. 933–937, 2004.
- GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES L. F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. 1 ed. Curitiba: Abifito, 2005.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M.G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**. V.1, p. 52-61, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n. 2, p. 374-381, 2007.

- GOMES, F. **Estudo dos Compostos voláteis do Alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), Hidrodestilação e Extração com fluido supercrítico (SFE)**. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2003.
- GOMES, S. V. F. 130 based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. **Analytica Chimica Acta**, 623: 146-156, 2008.
- GOMES, S. V. F. **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer**. Dissertação-Universidade Federal de Sergipe- São Cristóvão, 139f. 2009.
- GONÇALVES, G. B. **Identificação de constituintes voláteis de glândulas salivares de machos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha obliqua* (Díptera Tephritidae) e de seu hospedeiro *Averrhoa carambola* L.** 2005. 116 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2005.
- GONÇALVES, J. L. M.; ALVARES, C. A.; BEHLING, M.; ALVES, J. M.; PIZZI, G. T.; ANGELI, A. Produtividade de plantações de eucalipto manejadas nos sistemas de alto fuste e talhadia, em função de fatores edafoclimáticos. **Scientia Florestalis**, v. 42, n. 103, p. 411–419, 2014
- GONÇALVES, M. L. Q. **Boas práticas para medicamentos fitoterápicos em escala magistral no setor público**. Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, (Dissertação Mestrado), 2009.
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, 68(9): 305-309, 1996.
- GRIEVE, M. **A Modern Herbal**, 1931. Disponível em: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/senna-42.htm>L. Acesso em 07 março de 2018.
- GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRÍGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev Cubana Plant Med.**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.
- GUILLEN, M. E.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Atividade antissecretora e anti-úlceras do extrato aquoso da *Plantago major* (tanchagem) In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, 13., 1994, Fortaleza. Anais Simpósio de Plantas Mediciniais. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994.

- GUIMARÃES, E. C. B. T., RODRIGUES, C. R., DIAS, L. R. S., DORNELLAS, C. B., CASTRO H. C., CABRAL, L. M., SANTOS, T. C. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para o Controle Químico da Qualidade de Fitoterápicos à Base de Extrato Seco de Alcachofra. **Revista Fitos**, 3 (02): 64- 77, 2007.
- GUO, F. Q., LIANG, Y. Z., XU, C. J., HUANG, L. F.; LI, X. N. Comparison of the volatile constituents of *Artemisia capillaris* from different locations by gas chromatography-mass spectrometry and projection method. **J Chromatogr A** 1054, 73-79, Doi 10.1016/J.Chroma.2004.08.122 (2004).
- HABIB, A.; EL-SEBAKHY, N. Spectrophotometric estimation of sennosides and rhein glycosides in senna and its preparations. **J. Nat. Prod.** v.43(4), p.452-458, 1980.
- HAIR, J. F. J.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados. 6. ed.** Porto Alegre: Bookman: Artmed, 688 p. 2009.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa. 7. ed.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2008.
- HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Sec** 3:5- 17, 2011.
- HAUPTMANN, H.; NAZÁRIO, L. L. Some constituent of the leaves of *Cassia alata* L. **J. Am. Chem. Soc.** v.72, p.1492-1495, 1950.
- HELPER, S. M.; RODRIGUES, W. A.; CERVI, AC. O gênero *Plantago* L. (Plantaginaceae) na região Sul do Brasil. **Rev Bras Biocienc.** 2011 Jul/Sep;9(3)297-321.
- HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, 856: 3, 1999.
- HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. **Óleos Essenciais: Importância e Perspectivas Terapêuticas** In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. (Orgs.). Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Editora UNIVALI, 2009. p.165-166.
- HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. The quarterly review of biology. v. 67, n. 3, p. 283-335, 1992.
- HOHN, H. **Chemische Analysen mit dem Polarographen.** Berlin: Springer-Verlag. (1937).

- HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica chimica Acta**, 500: 365-377, 2003.
- HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Editora EdUFSCar, 2003. p. 152.
- HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, M. On line high-performance liquid-chromatography ultraviolet visible spectroscopy of phenolic compounds in plant-extracts using post-column derivatization. **Journal of CHROMATOGRAPHY A**, 283: 137, 1984.
- HOU, Y.; CAO, S.; BRODIE, P. J.; CALLMANDER, M. W.; RATOVOSON, F.; RAKOTOBÉ, E. A.; RASAMISON, V. E.; RATSIMBASON, M.; ALUMASA, J. N.; ROEPE, P. D.; KINGSTON, D. G. Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. V. 17(7), p. 2871–2876, 2009.
- HUBER, L. **Applications of diode-array detection in HPLC**. Agilent technologies, v. 12, 2009.
- HUSSAN, F.; MANSOR, A. S.; HASSAN, S. N.; KAMARUDDIN, T. N.; BUDIN, S. B.; OTHMAN, F. Anti-Inflammatory Property of Plantago major Leaf Extract Reduces the Inflammatory Reaction in Experimental Acetaminophen-Induced Liver Injury. Evidence-based complementary and alternative medicine : **eCAM**, 2015, 347861. 2015.
- HWANG, D.; FISCHER, N. H.; JANG, B. C.; TAK, H.; KIM, J. K.; LEE, W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 226: 810-818, 1996.
- HYUN, T. K.; EOM, S. H.; YU, C. Y.; ROITSCH, T. *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. **Planta Medica**. V. 76, p. 943–949, 2010.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003. Acessado em 30 de agosto de 2018.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH (1995). **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Methodology**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Guideline Q2B* - Genebra, Suíça.

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH (2005). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Guideline Q2 (R1)* - Genebra, Suíça.
- ISHIKAWA, N.; YOKOYAMA, J.; TSUKAYA, H. Molecular evidence of reticulate Evolution in the subgenus *Plantago* (Plantaginaceae). **Am J Bot.** 96(9):1627-35, 2009.
- IZHAKI, I. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist.** V.155, p. 205–217, 2002.
- IZZO, A. A.; SAUTEBIN, L.; ROMBOLA, L.; CAPASSO, F. The role of constitutive and inducible nitric oxide synthase in senna and cascara induced diarrhoea in the rat. **European Journal Pharmacology**; 323(1):93-7, 1997.
- JAMWAL, S. **Studies on some aspects of male sterility in *Plantago ovata* Forsk.** PhD Thesis, University of Jammu, Jammu, India. 2000.
- JANKOVIĆ, T.; MENKOVIĆ, N.; ZDUNIĆ, G.; BEARA, I.; BALOG, K.; ŠAVIKIN, K.; DUKIĆ, N. M. Quantitative Determination of Aucubin in Seven *Plantago* Species Using HPLC, HPTLC, and LC-ESI-MS Methods. *Analytical Letters* Volume 43, Issue 16, Pages 2487-2495, 2010.
- JANZEN, K. E.; WALTER, L.; FERNANDO, A. R. **Comparison analysis of illicit cocaine samples**, *J Forensic Sci*, Mar;37(2):436-45, 1992.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985. 777p.
- JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Rev Ciênc Farm**, São Paulo, v. 17, p. 139-145, 1996.
- KATO, E. T. M.; AKISUE, G. Estudo farmacognóstico de cascas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. **All. Lecta**, v. 20, n. 1, p. 69-76, 2002.
- KAWASHIMA, S.; SAKATO, M.; TERADA, S.; KOIDE, Y.; TANAKA, M.; KO, M. Antidiabetic agents containing lactones, *JP 2001247461*, **Kokai Tokkyo Koho, Japão**, 2001.
- KELLY, W. R.; PRATT, K. W.; GUTHRIE, W. F.; MARTIN, K. R. Origin and early history of Die Methode des Eichzusatzes or The Method of Standard Addition with primary emphasis on its origin, early design, dissemination, and usage of terms. **Anal. Bioanal. Chem.**, pp. 1805-1812, 2011.

- KHAN, S.; MIRZA, K. J.; AL-QURAINY, B. F.; ABDIN, M. Z. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. **Saudi J Biol Sci.** 2011 Jul; 18(3): 287–292. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.03.001
- KHORANA, M. L.; SABGHAVI, M. M. Two new glycosides from *Cassia angustifolia* pods. **J. Pharm. Sci.** v.53, p.110-113, 1964.
- KINGET, R. Studies of the drugs of anthraquinone principles. XVI. Determination of the structure of anthracene derivatives reduced from the bark of *Rhamnus purshiana* DC. **Planta medica.** 15(3):233-9, 1967.
- KIPARISSIS, Y.; BALCH, G. C.; METCALFE, T. L.; METCALFE, C. D. Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Environmental and Resource Studies**, v. 111, n. 9, p. 1158-1163, 2003.
- KOBASHI, K.; NISHIMURA, T.; KUSAKA, M.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. **Planta Med.** v.40(3), p.225-236, 1980.
- KOMOLAFE, O. O. Ion-pair partition chromatography analysis of anthraquinone glycosides of Senna and pharmaceutical preparations of Senna. **J. Chromatogr. Sci.** v.16, p.496-499, 1978.
- KONDO, K.; SUZUKI, Y.; IKEDA, Y.; UMEMURA, K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation, **European Journal of Pharmacology**, v. 455, p. 53–57, 2002.
- KONG, W. J.; ZHAO, Y. L.; XIAO, X. H.; JIN, C.; LI, Z. L. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of rhizoma *Coptidis chinensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. **Phytomedicine** 16, 950-959, doi:10.1016/j.phymed.2009.03.016, 2009.
- KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1(1): 1-7, 1996.
- KÖTSCHAU, A.; BÜCHEL, G.; EINAX, J. W.; MEIßNER, R.; TÜMPLING, W.V.; MERTEN, D. Element pattern recognition and classification in sunflowers (*Helianthus annuus*) grown on contaminated and non-contaminated soil. **Microchemical Journal**, v.114, p.164–174, 2014.

- KOWALSKI, B.R.; BENDER, C.F.; K-Nearest neighbor classification rule (pattern-recognition) applied to nuclear magnetic resonance spectral interpretation. *Analytical Chemistry*, 44(8): 1405, 1972.
- KRAUS Von L. Übersicht der analytischen methoden zur bestimmung von anthrachinondrogen. **Planta Med** v.7, p.427-446, 1959.
- KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; FERRARI, W. M. S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 96 (8), p.1033-1042, 2001.
- KRISCHIK, V. A.; DENNO, R. F. Individual, Population, and Geographic Patterns in Plant Defense. In: **Variable plants and herbivores in natural and managed systems**. Academic Press, INC: New York, 1983.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, n. 30, p. 71-88, 2002.
- KUSSMAUL, W; BECKER, B. Die kolorimetrische der Sennaglycoside. **Helv. Chim. Acta** v.30, p.59-63, 1947
- KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiol**. 2001 Jan;125(1):58-60.
- LADDHA, K. S. A modified method for the isolation of Rhein from Senna. **Med. Nat. Prod.** v.71 (2), p.128-129, 2009.
- LAMEIRA, O. A. **Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]**. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Circular técnica, 28, 2008.
- LANDIM, P. M. B. **Introdução à análise estatística de dados geológicos multivariados**. Depto Geografia Aplicada, UNESP/Rio Claro, Texto didático nº 15. 229 p. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/igce/aplicada/textodi.html>. Acesso em: 20 julho. 2018.
- LAVINE, B. K. in **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- LAWRENCE, J. F.; FREI, R. W. A quantitative assay for sennosides by fluorogenic derivatization on thin-layer chromatograms. **J. Chromatogr.** v.79, p.223-228, 1973.
- LEITE, A. C.; MATOS, A. P., L.; BATISTA-PEREIRA, G.; FERNANDES, J. B. VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Activity of Triterpenoids from *Cedrela*

- fissilis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda*. **Biopesticides International**, v. 4, n. 1, p. 28-34, 2008.
- LEITE, S. N.; SCHOR, N. Fitoterapia no Serviço de Saúde: significados para clientes e profissionais de saúde. **Saúde em debate**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 69, p. 78-85, jan-abr., 2005.
- LEMLI, J. The chemistry of Senna. **Fitoterapia**. v.57(1), p.33-40, 1986
- LEMLI, J. The estimation of anthracene derivatives in senna and rhubarb. **J. Pharm. Pharmacol.** v.17, p.227-234, 1965.
- LEMMENS, L. Determination of dihydroxydianthrones by densitometry after thin-layer chromatographic separation. **J. Chromatogr.** v.132, p.263-265, 1977
- LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas, Florianópolis**, v.17, n. 2, p. 67-89, 2004.
- LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. **J Sep Sci** 33, 410-421, doi:10.1002/jssc.200900653, 2010.
- LIANG., Y. Z.; XIEP, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, 812: 53–70, 2004.
- LICHTENSTEIGER, C. A.; JOHNSTON, N. A.; BEA, V. R. *Rhamnus cathartica* (Buckthorn) Hepatocellular Toxicity in Mice. **Toxicology Pathology**. V. 25, p. 449, 1997.
- LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.
- LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 83-85, 2004.
- LIMA, R. B. **Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.
- LIN, C. N.; CHUNG, M. I.; CAN, K. H.; LU, C. M. Flavonol and anthraquinone glycosides from *Rhamnus formosana*. **Phytochemistry**. V. 30 (9), p. 3103-3106, 1991.
- LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochem. Syst. Ecol.** 15:681–686, 1987.

- LINGEMAN, H.; HOESTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particleloaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 689: 221-237, 1997.
- LISSIN, L. W.; COOKE, J. P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 6. p. 1403-1410, 2000.
- LIU, C.; MANDAL, R.; LI, X-F. Detection of fortification of ginkgo products using nanoelectrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, 130(3):325-329, 2005.
- LIU, X.; ESPEN, P.V.; ADAMS, F.; YAN, S.H.; VANBELLE, M.; Classification of chinese tea samples according to origin and quality by principal component techniques. **Analytica Chimica Acta**, 200: 421, 1987.
- LÔBO, C. Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma revisão de literatura. **Rev. Divulgação Científica Sena Aires**. 2: 171-178, 2012.
- LONGO, L.; VASAPOLLO, G.; RESCIO, L. Identification of Anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.53, p. 1723-1727, 2005.
- LONGO, R; MEINARDI, G. Quantitative chromatographic determination of the active principles of senna (sennoside A, sennoside B). **Boll. Chim. Farm.** v.104(8), p.503-510, 1965
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: Instituto Plantarum;1982.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002. 512p.
- LUCENA, P. L. H.; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, supl. 2, p. 46-51, 2006
- MA, Y-C.; MANI, A.; CAI, Y. An effective identification and quantification method for Ginkgo biloba flavonol glycosides with targeted evaluation of adulterated products. **Phytomedicine**. 2016;23(4):377-387
- MACGARIGAL, K.; CUSHMAN, K.; SAMUEL A.; STAFFORD, S. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research**. New York: Springer Verlag, 2000. 423 p.

- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA - JÚNIOR, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAHADY, G. B. Cascara Sagrada (*Rhamnus purshiana*). In: COATES, P. M.; BLACKMAN, M. R.; CRAGG, G. M.; LEVINE, M.; MOSS, J.; WHITE, J. D. editors. **Encyclopedia of Dietary Supplements** (Print). New York: Marcel Dekker; 2004. p. 830.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT, S. S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. Ed. Elsevier Brasil, 12ª edição, 2010.
- MAI, L. P.; GUÉRITTE, F.; DUMONTET, V.; TRI, M. V.; HILL, B.; THOISON, O.; GUÉNARD, D.; SÉVENET, T. Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. **Journal of Natural Products**. V. 64, p.1162-1168, 2001
- MAILLARD, M. N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43 (7): 1789-1793, 1995.
- MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**. Vol. 33, p. 1559-1568, 2010.
- MALEŠ, Ž.; KREMER, D.; RANDIĆ, Z.; RANDIĆ, M.; PILEPIĆ, K.; BOJIĆ, M. Quantitative analysis of glucofrangulins and phenolic compounds in Croatian *Rhamnus* and *Frangula* species. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem; **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, 2010
- MANITTO, P.; MONTI, D.; SPERANZA, G. Studies on aloe. Part 6. Conformation and absolute configuration of aloins A and B and related 10-C-glucosyl-9-anthrones. **Journal Chemical Society**, Perkin Trans 1. (5):1297-300, 1990.
- MANITTO, P.; MONTI, D.; SPERANZA, G.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; GRIFFINI, A.; PIFFERI, G. Conformational studies of natural products. Part 4. Conformation and absolute configuration of cascarosides A, B, C, D. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 1.;14:1577-80. 1993
- MANITTO, P.; MONTI, D.; SPERANZA, G.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; GRIFFINI, A.; PIFFERI, G. Studies on cascara, part 2. Structures of cascarosides E and F. **Journal of Natural Products**.;58(3):419-23. 1995
- MANSOOR, K.; QADAN, F.; S.; MALLAH. E.; ABUDAYYIH, W.; MATALKA, K. Stability Study and a 14-Day Oral Dose Toxicity in Rats of Plantain Leaf Extract

- (*Plantago lanceolata* L.) Syrup, Scientia Pharmaceutica, 2017, 85, 15; doi:10.3390/scipharm85010015
- MAPA, **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**, Brasil: Brasília, 2011
- MARINI-BETTÒLO, G. B. **Chemistry of the active principles of Celastraceae**. 29, 9. 551-568, 1974
- MARQUES, L. C.; PETROVICK, P. R. **Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, cap. 14, p. 327- 369, 2007.
- MARTENS, H.; NAES, T., **Multivariate Calibration**, second ed., Wiley, New York, 1991.
- MARTIM, A. **L'analyse de données. Polycopié de cours ensieta** – 1463: pp. 23-39, (2004).
- MARTINDALE. **The Extra Pharmacopoeia, 27a ed.** The Pharmaceutical Press, London. p.1342-1343, 1977.
- MARTÍNEZ, M. J.; BELANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ N.; JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 52, n. 3, p. 171-174, 1996.
- MARTINEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana Del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.
- MARTINS, L. R. R. **Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *phyllanthus* (quebra-pedra)**. São Carlos, 2008. 154p. Tese (Doutorado)- Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.
- MARTORELLI, S. B. F.; PINHEIRO, A. L. B.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; BRAVO, F. Efeito antiinflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) a 30% em orabase – estudo in vivo. **Int J Dent.**, v. 10, n. 2, p. 80-90, 2011.
- MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M., DEMING, S. M., MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: A Textbook**. 5th edn, Elsevier Science B.V., 2003.

- MATHWORKS. https://www.mathworks.com/help/bioinfo/ref/seqlinkage.html?s_tid=srchtitle. Acessado em 29/11/2017.
- MATHWORKS.https://www.mathworks.com/help/bioinfo/ref/seqlinkage.html?s_tid=srchtitle Acessado em 31 de outubro de 2017 .
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.
- MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise Exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, 6: 38-50, 2003.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4. ed. Fortaleza: UFC, 2002.
- McMASTER, M. C. **HPLC a Practical user's guide**. John Willey & Sons. Inc. 1994, 211p.
- MELO, A. D. B.; GOIS, F. D.; ANDRADE, C.; ROSTAGNO, M. H.; COSTA, L. B. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 227 - 232, jul. 2017. ISSN 1981-4178.
- MERLE, J.; BARTHES, D. BESSON, J. Étude par chromatographie liquid haute performance de L'évolution des sennosides A et B em solution. **II Farmaco**, v.39(7), p. 233-242, 1984.
- MESSINA, M.; MESSINA, V. Soyfoods, Soybean Isoflavones, and Bone Health: A Brief Overview. **Journal of Renal Nutrition**, v. 10, (2), p. 63-68, 2000.
- METZGER, W.; REIF, K. Determination of 1,8-dihydroxyanthranoids in senna. **J. Chromatogr. A**, 740, p.133-138, 1996.
- MEUDT, H.M. A taxonomic revision of native New Zealand *Plantago* (Plantaginaceae). **New Zeal J Bot.** 2012;50(2):101-178.
- MEYER, V. R. **Reversed-phase chromatography**. In: *Practical High-Performance Liquid Chromatograph*. Chichester: Wiley; 144-157, 1993.
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: UFMG, 2007.
- MOK, D. K. W.; CHAU, F.-T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemom. Intell. Lab. Syst.** 82, 210-217 (2006).

- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím. Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896 2005.
- MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: Suas Aplicações**. Editora médica e científica LTDA (MEDSI), p. 240, 1996
- MOREAU, R. L.; SIQUEIRA, M. E. P. **Toxicologia analítica**. Guanabara-Koogan, 2008.
- MOREIRA, J. A. **Controle Biorracional de pragas: isolamento, identificação e síntese de semioquímicos**. 2003. 152 f. Tese (Doutorado em Química orgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.
- MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**. V. 66, p. 2571–2576, 2005
- MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Aplicação da Análise Exploratória na diferenciação de vegetais. **Brazilian Journal Food Technology**, 2: 73-79, 1999.
- MORTON, J. F. Brazilian pepper – It's na impact an people, animals and environment. **Economic Botany**, v. 32, n. 4, p. 353-359, 1978.
- MOURA, F. T.; VIEIRA, M. A. R.; FACANALI, R.; HABER, L. L.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M. O. M. **Caracterização química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira vermelha)**. In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2007, Fortaleza: Parque de Desenvolvimento Tecnológico. Anais... Fortaleza, 2007.
- MUHAMMAD, K. W.; NAVEED, A.; REHAN, M.; MUHAMMAD, J.; HAJI, M. SH. K.; GHULAM, M. Dermatological and cosmeceutical benefits of *Glycine max* (soybean) and its active components. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Vol. 72 No. 1 pp. 3-11, 2015
- MÜLLNER, D. Modern hierarchical, agglomerative clustering algorithms. 2011. Disponível em: <https://arxiv.org/pdf/1109.2378.pdf%20>, acesso em 31 de outubro de 2017.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNO, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, 29(6): 1401-1406, 2006.
- NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, 21(4): 467-469, 1998.

- NG, L. T.; LIN, C. C.; LU, C. M. Antioxidative effects of 6-Methoxysorigenin and Its Derivatives from *Rhamnus nakaharai*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. V.55(3), p.382-384, 2007.
- NIELSEN, N-P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning on single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of chromatography**, vol A, no. 805, pp. 17-35, 1998.
- NISAR, M.; ADZU, B.; INAMULLAH, K.; BASHIR, A.; IHSAN, A.; GILANI, A. H. Antinociceptive and Antipyretic Activities of the *Zizyphus oxyphylla* Edgew. Leaves. **Phytotherapy Research**. V. 21, p. 693–695, 2007.
- NOVAES, T. S., COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANCA, F.; GIULIETTE, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antimicrobiana de alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl. 2, p. 5-7, 2003.
- NUNES JÚNIOR, J. A. T.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G.; INÁCIO, C. M.; NEGRÃO, A. W.; LUCENA, P. L. H. de; MOREIRA, H.; WAGENFUHR JÚNIOR, J.; CRUZ, J. J. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) no processo de cicatrização da linea alba de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, supl. 3, p. 8-15, 2006
- NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINOMEN, S.; HOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavone content of the soy based supplements. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1- 11, 2002.
- OKIGBO, R. N.; EME, U. E.; OBBOGU, S. Biodiversity and conservation of medicinal and aromatic plantas in Africa. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 6, p. 127-134, 2008.
- OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction Chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, 913: 113, 2001.
- OSHIO, H.; IMAI, S.; SUGAHARA, T.; MIYAMOTO, M.; TSUKUI, M. Investigation of Rhubarbs. II. Isolation of Sennoside E, a new purgative compound. **Chem. Pharm. Bull.** v.20(3), p.621-622, 1972.
- PACIORNIK, E. F. **A planta nossa de cada dia**. Curitiba: Copygraf, 1990.
- PALACIOS, F. J. J. M.; MOCHÓN, C. N; SÁNCHEZ, J. C.; LÓPEZ, J. M. A. B.; PEREZ, A. G. Validation of an HPLC Method for Determination of Cefepime (a

- Fourth-Generation Cephalosporin). Determination in Human Serum, Cerebrospinal Fluid, and Urine. Pharmacokinetic Profiles. **Chromatographia**, Volume 62, Issue 7–8, pp 355–361, 2005.
- PANDEY, M. B.; SINGH, A. K.; SINGH, V. P.; PANDEY, V. B. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus sativa* bark. **Natural Product Research**. V. 22 (3), p. 219–221, 2008
- PANETTA, F. D.; MCKEE, J. Recruitment of the invasive ornamental, *S. terebinthifolius*, is dependent upon frugivores. **J Ecol**, v. 22, n. 4, p. 432-438, 1997.
- PARIS, R. The distribution of plant glycosides. **Chemical Plant Taxonomy**. London: Academic Press Inc.; 1963. p. 337-58.
- PEDREIRA, M. S.; REIS, R. A.; BERCHIELLI, T. T.; MOREIRA, A. L.; COAN, R. M. Características agronômicas e composição química de oito híbridos de Sorgo bicolor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1083–1092, 2003.
- PELOZO, M. I. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELLO, J. C. P. de. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3.p. 447-51, 2008.
- PENALVO, J. L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**, v. 87, p. 297–305, 2004.
- PENG, W. H.; HSIEH, M. T.; LEE, Y. S.; LIN, Y. C.; LIAO, J. Anxiolytic effect of seed of *Zizyphus jujuba* in mouse models of anxiety. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 72, p. 435–441, 2000
- PEREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. Monografia (Licenciatura em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- PEREIRA-DA-SILVA, C.S. **As plantas medicinais no Município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil: uma abordagem etnobotânica**, 2007, 153 fl. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília. Brasília, 2007.
- PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v.3, p.238-239; v.5, p.108-129, 1984.
- PLANTAMED. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Cassia_occidentalis.htm. Acesso em 07 março de 2018.

- PORTER, C. L. **Taxonomy of flowering plants. 2nd ed.** San Francisco: Freeman, c1959. xii, 452p.
- PRADO, B. Q. M. **Análise de agrupamentos das taxas de incidência de dengue nos estados brasileiros.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2015.
- PROTÁSIO, T. P.; BUFALINO, L.; JUNIOR, M. G.; TONOLI, G. H. D.; TRUGILHO, P. F. Técnicas multivariadas aplicadas à avaliação de resíduos lignocelulósicos para a produção de bioenergia. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 4, p. 771–781, 2013b.
- PROTÁSIO, T. P.; COUTO, A. M.; REIS, A. A.; TRUGILHO, P. F. Seleção de Clones de Eucalyptus para a produção de carvão vegetal e bioenergia por meio de técnicas univariadas e multivariadas. **Scientia Forestalis**, v. 41, n. 97, p. 15–28, 2013a.
- QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Braz Arch Biol Technol**, v. 41, p. 247- 253, 1998.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, 24(1): 68-76, 2001.
- QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F. C.; JARDIM, I. C. S. F. Poly (methyloctadecylsiloxane) immobilized on silica by radiation for use in solidphase extration. **Journal Chromatography A**, 948: 171-176, 2002.
- QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F. C.; JARDIM, I. C. S. F. Poly (methyloctadecylsiloxane) immobilized on silica by radiation for use in solidphase extration. **Journal Chromatography A**, 948: 171-176, 2002.
- QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, R. T.; SCRAMIN, S. **Importância dos Fitoestrógenos Presentes na Soja Para a Saúde Humana.** EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, Fevereiro, 2006
- RAHN, K. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. **Bot J Linn Soc.** 1996; 120:145-198.
- RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 12, p. 57-69, 2001.
- READER'S DIGEST BRASIL, RIO DE JANEIRO. **Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais**, p.416, 1999.

- REETZ, E. R. *et al.* **Anuário Brasileiro de Algodão**. Santa Cruz do Sul, RS: Gazeta, 2013. 144 p
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Sellowia: anais botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 70, n. 34/35, p. 5-483, 1983.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27(5): 771-780, 2004.
- RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. odonto ciênc.**, v. 21, n. 53, p. 245- 252, 2006.
- RICHARDSON, J. E.; FAY, M. F.; CRONK, Q. C. B.; BOWMAN, D.; CHASE, M. W. A phylogenetic of Rhamnaceae using rbcL and trn-F plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**. v.87, n.9. p.1309-1324, 2000.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. p.1-14.
- RODRIGUEZ, S.; MURRAY, A.P. Volatile components of *Discaria americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae). **Natural Product Research**. V. 22 (3), p. 253–257, 2008.
- RØNSTED, N.; CHASE, M.; ALCH, D.; BELLO, M. Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid trnL-F sequence data. **Bot J Linn Soc**. 2002;139(4):323-38
- ROSAS, L. V.; CORDEIRO, M. S. C.; CAMPOS, F. R.; NASCIMENTO, S. K. R.; JANUÁRIO, FRANÇA, A. H.; NOMIZO, S. C. A.; TOLDO, M. P. A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P. S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 40, p. 663-670, 2007.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recente pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, V. 1158, p.111-125, 2007.
- RUHOFF, A. L.; SALDANHA, C. B.; COLLISCHONN, W.; WATER, C. B. U.; ROCHA, H. R.; CABRAL, O. M. R. Análise multivariada do processo de evapotranspiração em áreas de cerrado e cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 14, n. 4, p. 137–146, 2009.

- SAGARA, K.; OSHIMA, T.; YOSHIDA, T. Rapid and simple determination of sennoside A and B in Rhei rhizoma by ion-pair High-Performance Liquid Chromatography. **J. Cromatogr.** v.403, p.253-261, 1987.
- SALVI JÚNIOR, Ademir. *Schinus terebinthifolius* Raddi: **estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações**. 2009. 74 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96251>>.
- SANCO, COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES. **Document n° SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures**. 3ª ed., Bruxelas, Belgica,
- SANGWAN, R. S.; CHAURASIYA, N. D.; MISRA, L. N.; LAL, P.; UNIYAL, G. C.; SHARMA, R.; SANGWAN, N. S.; SURI, K. A.; QAZI, G. N.; TULI, R. Phytochemical variability in commercial herbal products and preparations of *Withania somnifera* (Ashwagandha). **Curr Sci.** 86:461-465. 2004.
- SANTCHURN, D.; RAMDOYAL, K., BADALOO, M. G. H.; LABUSCHAGNE, M. From sugar industry to cane industry: investigations on multivariate data analysis techniques in the identification of different high biomass sugarcane varieties. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 543-558, 2012.
- SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Rev. Bras. de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.
- SANTOS, A. M. A.; AVELAR, K. E. S. **A contribuição da fitoterapia popular para o tratamento de infecções ginecológicas**. In: XI Congresso Luso Afro Brasileiro de Ciências Sociais, 2011, Salvador. Anais... Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2011
- SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, 21 (2): 135-140, 1998.
- SANTOS, S. B.; LIMA, A. C. A.; MELO, A. R. S.; FRAZÃO, C. S.; CHERPAK, G. L. Comparação da eficácia da aroeira oral (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com omeprazol em pacientes com gastrite e sintomas dispépticos: estudo randomizado e duplo-cego. **GED gastroenterol. endosc. dig.**, v. 29, n. 4, p. 118-125, 2010.

- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Volume 30, Issue 12, Pages 3875-3883, 1991.
- SCHENKEL, E. P. **Cuidados com os medicamentos**. 2. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2004. 163p.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Orgs.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 371-400.
- SCHULTZ, A. R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática: para uso nas faculdades de filosofia, de farmácia, escolas de agronomia, engenharia, geologia, etc.** 3. ed. Porto Alegre, RS: Globo, 1968.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; BLUMENTHAL, M.; TYLER, V. E. **Rational Phytotherapy - A Reference guide for Physicians and Pharmacists**. 5a ed. Springer, Berlin, 2004. 417p.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional**. São Paulo: Editora Manole, 4a.ed., 2002.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química nova**, 23(4): 547-556, 2000.
- SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.
- SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, 987: 57-66, 2003.
- SHAH, S. A.; RAVISHANKARA, M. N.; NIRMAL, A.; SHISHOO, C. J.; RATHOD, I. S.; SUHAGIA, B. N. Estimation of individual sennosides in plant materials and market formulations by an HPTLC method. **J. Pharm. Pharmacol.** v.52, p.445-449, 2000.
- SHAW, P. C.; BUT, P. P. H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. **Planta Medica**, v. 61, p. 466-469, 1995.
- SHEN, S.; QIAN, J.; REN, J. Ethnoveterinary plant remedies used by Nu people in NW Yunnan of China. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, 6, 24, 2010.
- SILVA, F. V.; KAMOGAWA, M. Y.; FERREIRA, M. M. C.; NOBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. A discriminação geográfica de águas minerais do Estado de São Paulo através da análise exploratória. **Eclética Química**, 27: 91-102, 2002.

- SILVA, L. B. L. **Preparação e avaliação biofarmacêutica de formas semi-sólidas da Aroeira da Praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.
- SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1929.
- SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H. M.; MARCUS VINÍCIUS M. **Plantas Medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Disponível em: http://www.traffic.org/publications/traficc_portu.pdf Acesso em: 17 jul. 2018.
- SILVA-CORAZZA, P. E. R.; LOPES, G. C.; DICIAULA, M. C.; LIMA, M. M. S.; MELLO, J. C. P. de. Pharmaceutical topical gel: development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of polyphenols. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.5, p.1-5, 2010.
- SILVERSTEIN, R. M. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A-1994, v.4, 5a edição, 1994, p.387.
- SILVERTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara, 3ª ed., Rio de Janeiro – RJ, 1979.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª edição**, ed. UFRGS, 2000;
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 467-495.
- SINGH, S.; PANDEY, M. B.; SINGH, A. K.; SINGH, U.; PANDEY, V. B. A new chalcone glycoside from *Rhamnus nipalensis*. **Natural Product Research**. V. 22 (18), p.1657–1659, 2008.
- SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in highperformance liquid chromatographic method development- use of starting gradient run. **Journal Chromatography A**, 721: 3-14, 1996.

- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3rd Edition, 960 pages. ISBN: 978-0-470-16754-0, Ed. Wiley, 2010.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, New York: John Wiley and Sons, 2. Edição, 1997.
- SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.**, v. 7, n. 3, p. 253-257, 2007.
- SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. **Food Chemistry**, 113(2): 568-574, 2009.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**, WH Freeman and company, New Yorkk, 2013.
- SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 1474S1479S, 1998
- SOUSA, C. M. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, 30: 351-355, 2007.
- SOUSA, O. V.; OLIVEIRA, M. S.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; ZANCANELLA, C. R.; LEITE, M. N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13(supl.): 30-34, 2003.
- SOUZA, C. R. F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.
- SOUZA, L. F. L. **Atividade antimicrobiana de extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a bactérias relacionadas à mastite bovina**. 54 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

- SOUZA, V. C. L, H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum; 2005
- SOUZA, V.C.; HASSEMER, G. **Lista de Espécies da Flora do Brasil** [Internet]. Rio de Janeiro. [acesso em: 2018 jan 28]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>.
- SOYSTATS, '**World soybean production 2010'**, 2011, http://www.soystats.com/2011/page_30.htm Acessado em 21 julho 2017.
- STASI, L. C. D. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1995.
- STOLL, A.; BECKER, B.; KUSSMAUL, W. Die Isoierung der anthraglycoside aus sennadrogen. **Helv. Chim. Acta**. v.252, p.1892-1902, 1949.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.** 2 (3): 12- 20. 1998.
- SYDISKIS, R. J.; OWEN, D. G.; LOHR, J. L.; ROSLER, K. H.; BLOMSTER, A. R. N. Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted from Plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.35 (12), p. 2463-2466, 1991.
- TASHIRO, Y.; TAKAHIRA, K.; NAKANISHI, Y. Improved application of recombinant yeast assays on environmental samples by size exclusion chromatography. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 6, p. 546-551, 2004
- TERENCIO, M. C.; SANZ, M. J.; PAYA, M. A hypotensive procyanidin-glycoside from *Rhamnus lycioides* ssp. *Lycioides*. **Journal of Ethnopharmacology**. V.30, p. 205-214, 1990.
- TERENCIO, M. C.; SANZ, M. J.; PAYA, M. Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 31, p. 109-114, 1991.
- THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL. **The Complete German Commission e Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines**, 1.ed., Boston, 1998.
- THOMAS, E. V. A Primer on Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, 66(15): 795 - 803, 1994.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, ISO, IUPAC and AOAC International Technical report. **Pure Appl. Chem.**,71 (2): 337- 348, 1999.

- TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. e COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quím. Nova**, vol.25, no.4, São Paulo July 2002, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400017>
- TOTTI, R.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Utilização de métodos de agrupamentos hierárquicos em acessos *Paspalum* (Gramínea - Poaceae). **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 22, p. 25-35, 2001.
- TRIPANI, S.; CHOWDHURY, A. R. Essential oil from leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ind. Perfumer** 45: 257-259, 2001.
- TRISOJA, **Isoflavonas**. Disponível em: <http://www.trisoja.com/por/pdf/isoflavonas.pdf>. Acesso em: 02 junho 2018.
- TSIAPARA, A. V.; JAAKKOLA, M.; CHINO, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. **Food Chemistry**, 116: 702-708, 2009.
- TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p.3-10. (Biology and resource management series)
- UPADHYAY, A.; CHANDEL, Y.; NAYAK, P. S.; KHAN, N. A. Sennoside contents in Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) as influenced by date of leaf picking, packaging material and storage period. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v.2, n.5, p.97-103, 2011.
- USP - **USP's revision of the standard for Wheat Starch has been approved by the Pharmacopeial Discussion Group (PDG) and will be incorporated with the second supplement within USP 35- NF 3**
- VALLE, I. **Aplicação de ferramentas estatísticas e de métodos quimiométricos clássicos no tratamento da informação multivariada relativa à caracterização físico-química de vinhos**. Dissertação de Mestrado em Química – Controle da Qualidade e Ambiente. Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra. pp. 98 – 111. (2012).
- VALLE, J. R. **A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas**, Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, 1978.

- VAN DEN BERG, A. J. J.; LABADIE, R. P. Anthraquinones, Anthrones and Dianthrones in Callus Cultures of *Rhamnus frangula* and *Rhamnus purshiana*. **Planta Med.** 50(05):449-51, 1984.
- VAN DEN BERG, A. J. J.; RADEMA, M. H.; LABADIE, R. P. A high-yielding callus culture of *Rhamnus purshiana* by visual selection. **Journal of Natural Products.** 50(5):940-3, 1987.
- VAN DEN BERG, A. J. J.; RADEMA, M. H.; LABADIE, R. P. Effects of light on anthraquinone production in *Rhamnus purshiana* suspension cultures. **Phytochemistry.** 1988;27(2):415-7.
- VAN GORKOM, B. A. P.; DEVRIES, E. G.; KARRENBELD, A.; KLEIBEUKER, J. H. Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics.** V.13, p. 443- 452, 1999.
- VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JING, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B.** Amsterdam; Elsevier, 1998.
- VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova,** 28(3): 519-528, 2005.
- VELÁSQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia, Amsterdam,** v. 74, n. 1/2, p. 91-97, 2003.
- VENUGOPAL, K.; SINGH, S. Evaluation of gelatins for cross-linking potential. **Pharmaceutical Technology,** v.1, p.32-37, 2001
- VERMA, R. K.; UNİYAL, G. C.; SINGH, S. P.; SHARMA, J. R.; GUPTA, M. M. Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography of Sennosides in *Cassia angustifolia*. **Phytochem. Anal.** v.7, p.73-75, 1996.
- VIANA, F. A. C. **Estudo comparativo, randomizado para avaliar a eficácia terapêutica da puperazina hexahidratada com estrato fluido de *Rhamnus purshiana* no tratamento de ascaridíase.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 156 páginas, 2007.
- VICINI, L.; SOUZA, M. A. **Análise multivariada da teoria à prática.** UFSM: CCNE, 2005. 215 p.
- VILELA, A.; MONTEIRO, B.; CORREIA, E. Perfil sensorial de vinhos do porto: análise em componentes principais categórica, uma abordagem para o tratamento de dados sensoriais, **Ciência Téc. Vitiv.,** 30: pp. 1-8, (2015).

- VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia**. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Orgs.). Feromônios de insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Editora HOLOS, 2ª edição, 2001. p. 9-23. 147
- VILELA, J. D. Mummification and medicine in ancient Egypt, **Revista Paulista De Medicina**. May-Jun;89(5-6):115-24, 1977.
- VINUESA, J. C.; FARIA, J. B.; CÉSAR, T. B. Hesperidina diminui o colesterol de ratos alimentados com gordura saturada. **Alimentos e Nutrição**, 19(4): 473-479, 2008.
- VINUESA, J. C.; FARIA, J. B.; CÉSAR, T. B. Hesperidina diminui o colesterol de ratos alimentados com gordura saturada. **Alimentos e Nutrição**, 19(4): 473-479, 2008.
- VITALE, M.; MAVRINAC, S. C.; HAUSER, M. New process/financial scorecard: a strategic performance measurement system. **Planning Review**, v. 22, n. 4, p. 12-16, 1994
- WALCZAK, B.; MASSART, D. L. Wavelets — something for analytical chemistry? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Volume 16, Issue 8, September 1997, Pages 451-463
- WANG, C.; SHERRARD, M.; PAGADALA, S.; WIXON, R.; SCOTT, R. A. Isoflavone content among maturity group 0 to II soybeans. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 77, p. 483-487, 2000.
- WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.** v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A. Ação anti-inflamatória e cicatrizante da *Schinus aroeira* Vell em pacientes portadoras de cervicites e cérvico-vaginites. **Rev Inst Antibiot**, v. 14, n. 1/2, p. 105-106, 1974
- WEI, B. L.; LU, C. M.; TSAO, L. T.; WANG, J. P.; LIN, C. N. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Quercetin 3-O-Methyl Ether and Other Constituents from *Rhamnus* Species. **Planta Medica**. V. 67, 2001.
- WELLS, D. E.; COFINO, W. P.; QUEVAUVILLER, P.; GRIEPINK B. Quality Assurance of Information in Marine Monitoring: A Holistic Approach. **Marine Pollution Bulletin**, vol.26. nº 7 pp 368-375, 1993.
- WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3ª edição, New York : Wiley-VCH, 1999.

- WERNER, L.; LINDEN, J. C. S. V. D.; RIBEIRO, J. L. D. Análise da percepção sobre assentos de trabalho utilizando técnicas estatísticas multivariadas. **Produção**, v.13, n. 3, p. 34-49, 2003.
- WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environ Health Perspect.** Mar;109 Suppl 1:5-20. 2001.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants.** Geneva, 1999, v.1.
- WHO, IUCN & WWF. J. LEAMAN, D. Medicinal Plant Conservation. Newsletter of the Medicinal Plant Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission. Geneva, v.9,10, p.88, 2004. Disponível em: cmsdata.iucn.org/downloads/mpc10.pdf. Acesso em: 06 de jul. 2018.
- WILKENS, R. T.; SPOERKE, J. M.; STAMP, N. E. Differential Responses of Growth and Two Soluble Phenolics of Tomato to Resource Availability. **Ecology**. v. 77, n.1, p. 247-258, 1996.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. Volume 2, Issues 1–3, Pages 37-52, 1987;
- WOLD, W.; GELADI, P.; ESBENSEN, K. H.; OHMAN, J. Multiway principal components-and PLS-analysis. **Journal of Chemometrics**, 1: 41-56, 1987.
- XAVIER, M. N. A. **Fitoterapia no combate das afecções bucais.** São Paulo: Idéias, 1995.
- XIE, P.; CHEN S.; LIANG Y.; WANG X.; TIAN R.; UPTON R. Chromatographic fingerprint analysis - a rational approach for quality assessment of traditional chinese herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 171-180, 2006.
- YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-graduação - IAC, Campinas. 2006.
- YANG, L.; WU, D.; TANG, X.; PENG, X.; WANG, X.; MA, Y.; SU, W. *Fingerprint quality control of Tianjihuang by high performance liquid chromatography photodiode array detection*, **J. Chromatogr. A** 1070, 35-42, 2015.
- YARNELL, E. **Plant Chemistry in Veterinary Medicine: Medicinal Constituents:** Mosby Elsevier; 714 p. 2007.
- YOSHIMURA, I.; YASUHIRO, K.; YOSHIKAZU, Y.; HUNECK, S.; YASUYUKI, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid

- chromatography with a photodiode-array detector. **Phytochemical Analysis**, 5: 197, 1994.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 24(1): 147-152, 2001.
- ZANON, A; MEDEIROS, A. C. S. Conservação de sementes de fruto-de-pombo (*Rhamnus sphaerosperma* SWARTZ). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, p.29-39, 2002.
- ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14(1): 29-39, 2004.
- ZHANG, M. H.; XU, Q. S. e MASSART, D. L. Robust principal components regression based on principal sensitivity vectors. **Chemom. Intell. Lab. Systems**, 67, 175-185, 2003.
- ZILIOTTO, J.; FARINA, C.; CRISTHINIA, K. B. S. Validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 33 (03): 341-346, 2012.
- ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M.; RATES, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(2): 25-31, 1999.
- ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H.; BICCHI, C. Avaliação da qualidade de drogas vegetais a base de *Passiflora* spp. Comercializadas no Brasil: presença de resíduos de pesticidas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 6(2): 60-66, 2004.
- ZUPAN, J.; BOHANEK, S.; RAZINGER, M.; NOVIC, M. Reduction of the information space for data collections. **Analytica Chimica Acta**, Volume 210, Pages 63-72, 1988.
- ZWAVING, J. H. High-voltage paper electrophoresis for the separation of 1,8-dihydroxyanthracene derivatives in senna and rhubarb. **J. Chromatogr.** v.97, p.109-111, 1974.



Fonte: <http://www.balancemebeautiful.com/rosemary-essential-oil-benefits/>

Apêndice

12. Apêndice

12.1 Apêndice A

Espectros de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido em **Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD**, Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C.

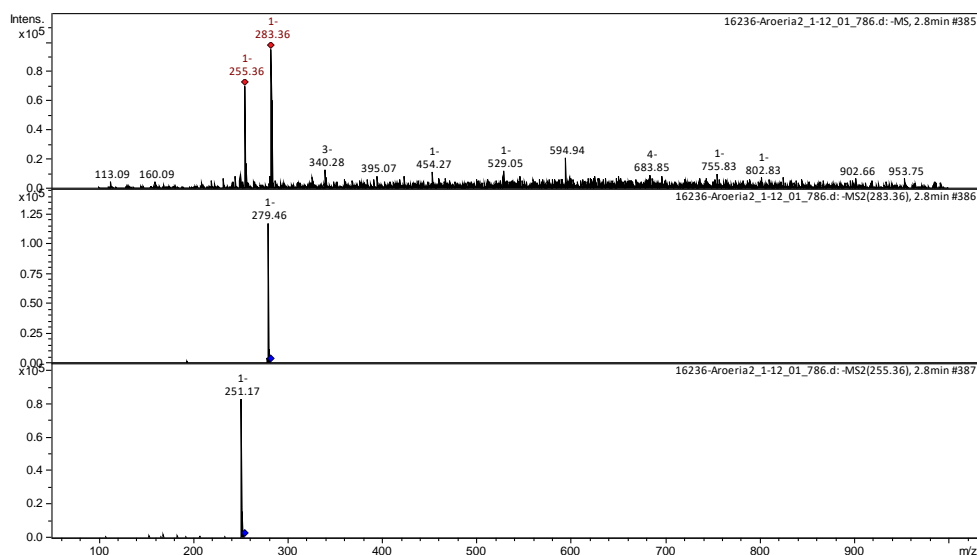


Figura 169: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 2,8 minutos.

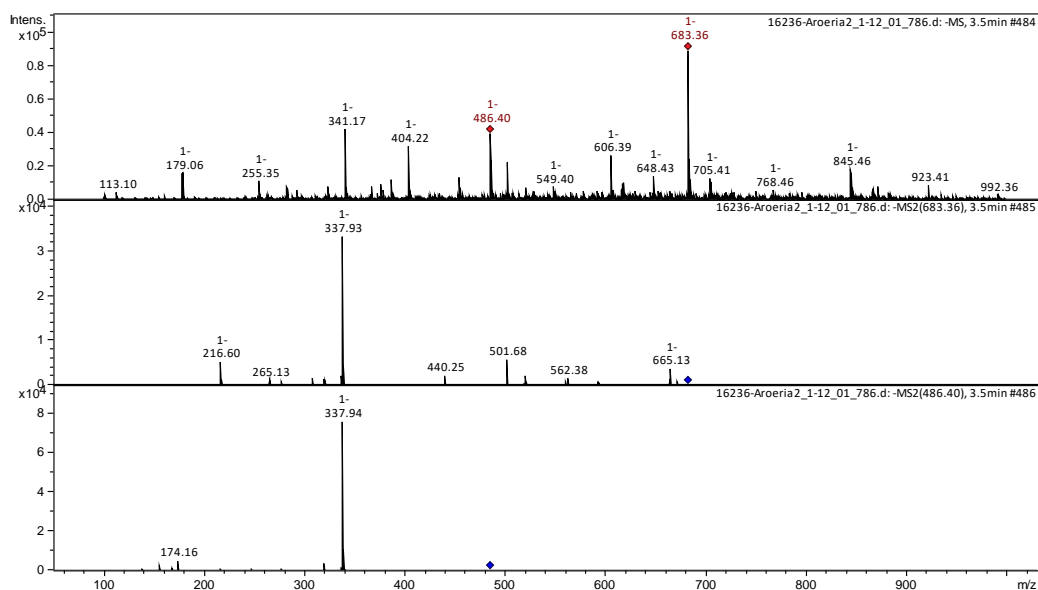


Figura 170: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 3,5 minutos.

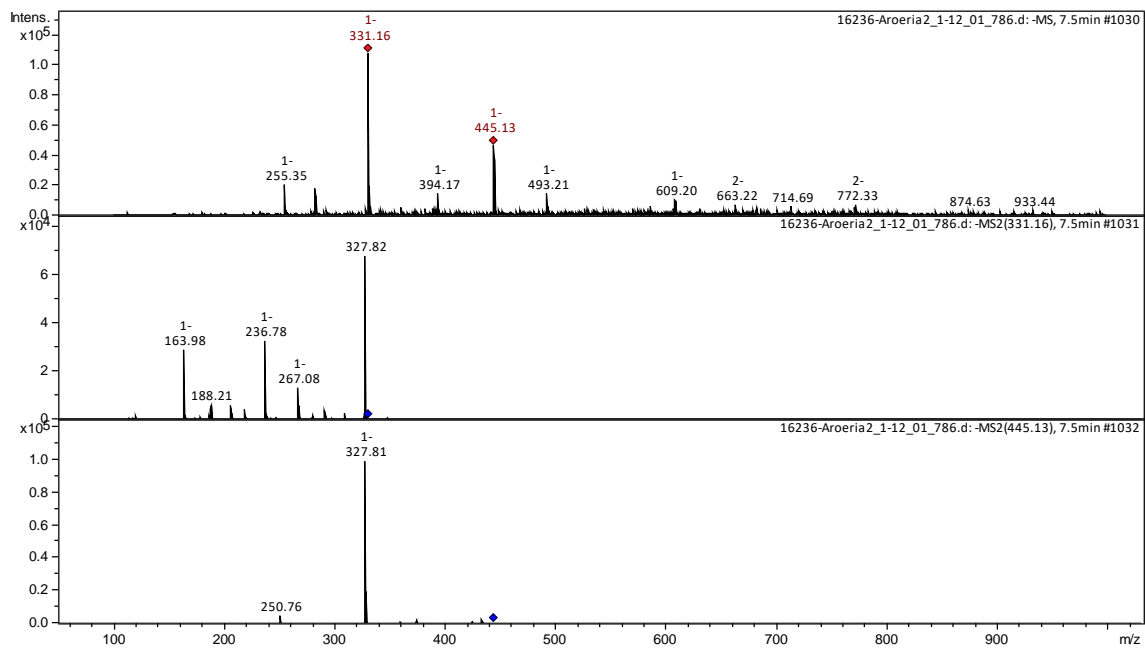


Figura 171 Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 7,5 minutos.

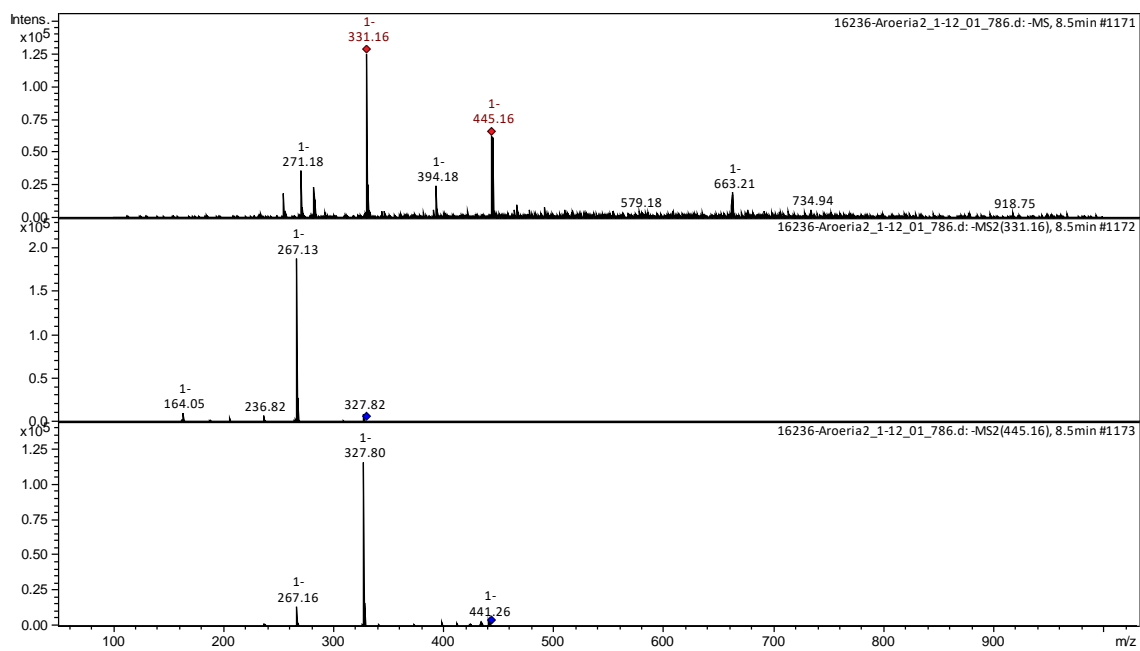


Figura 172: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 8,5 minutos.

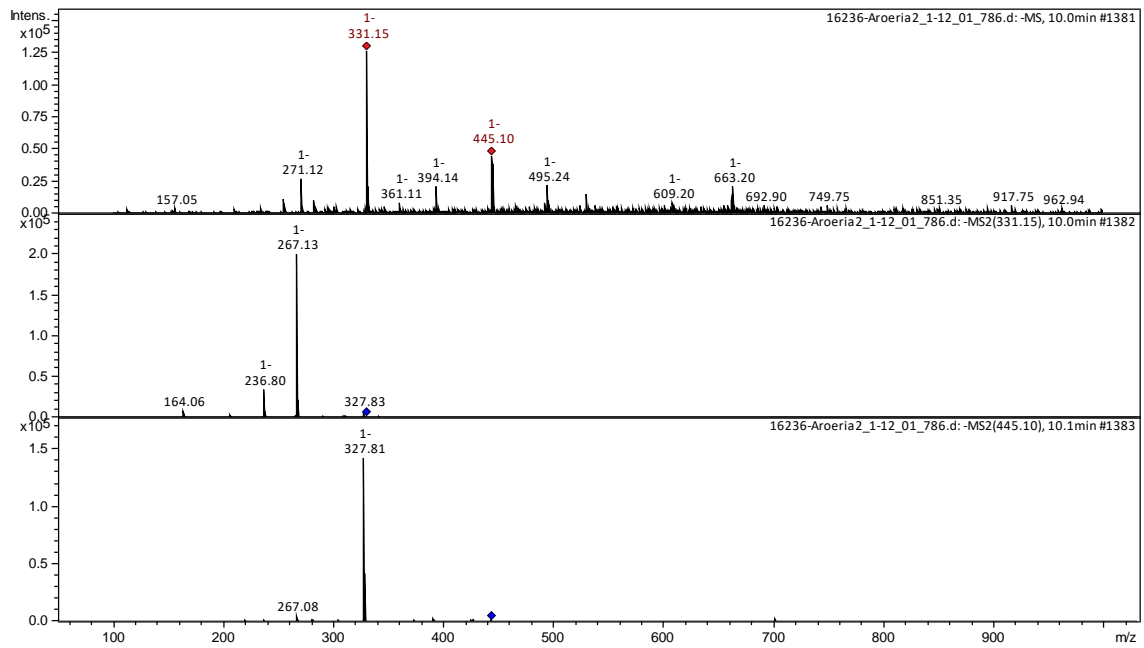


Figura 173: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 10,0 minutos.

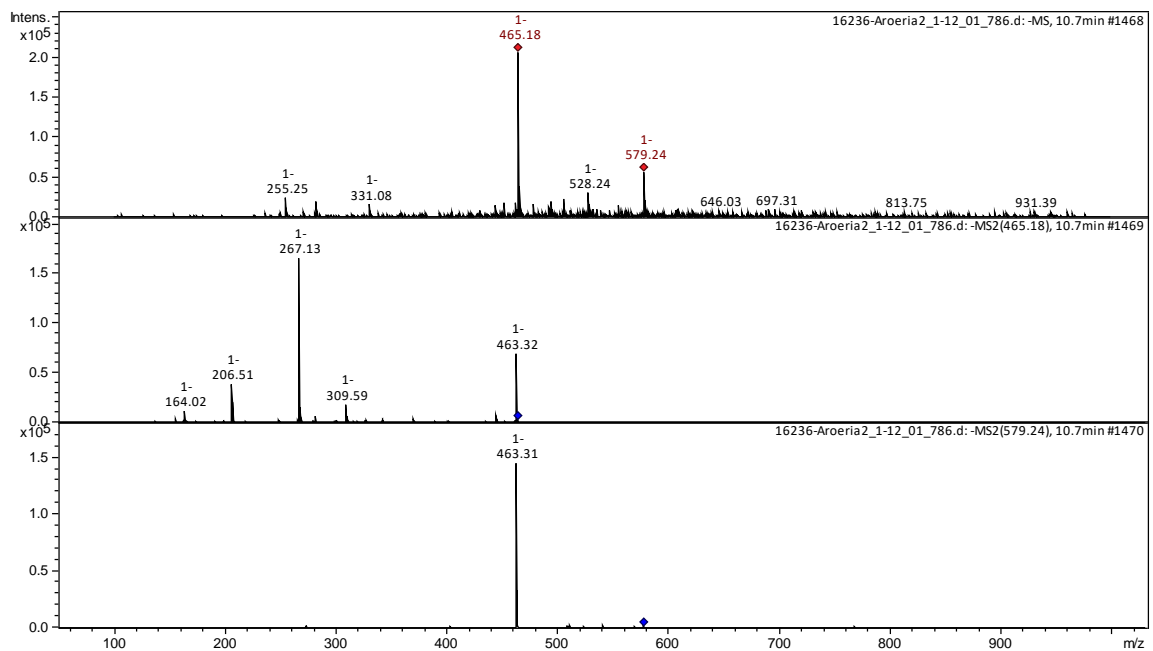


Figura 174: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 10,7 minutos.

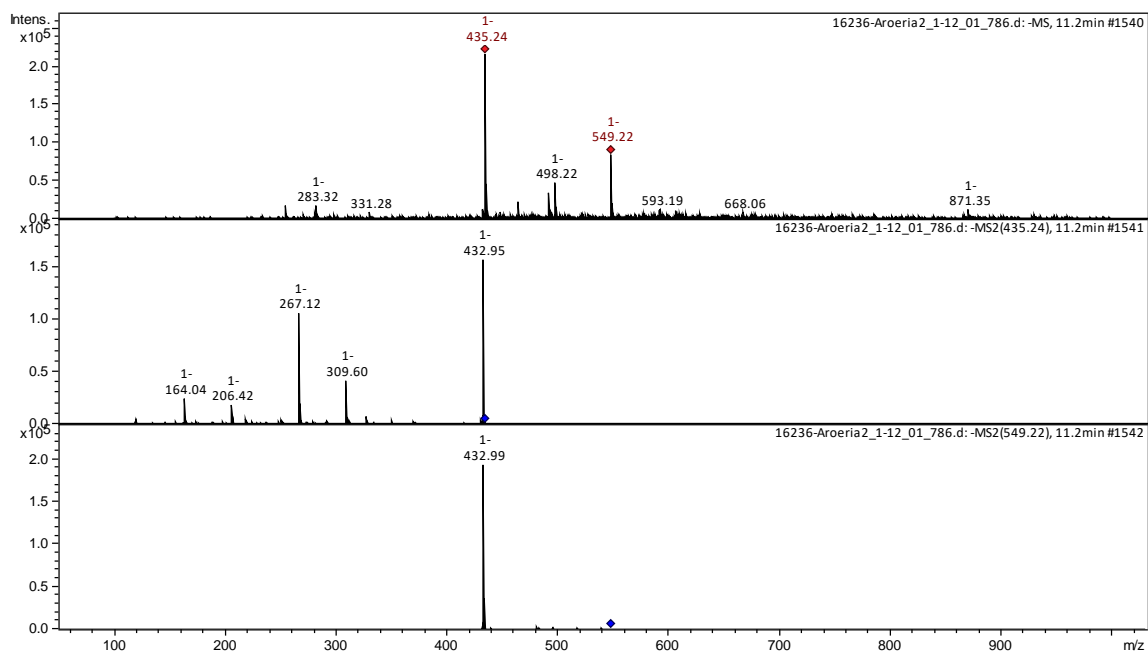


Figura 175: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 11,2 minutos.

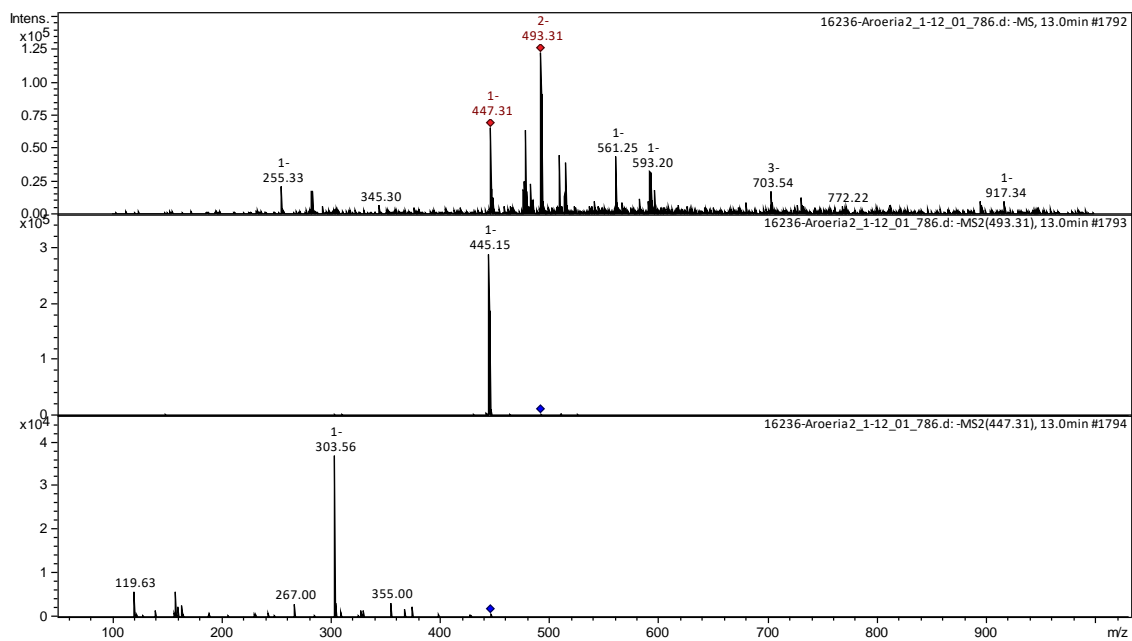


Figura 176: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 13,0 minutos.

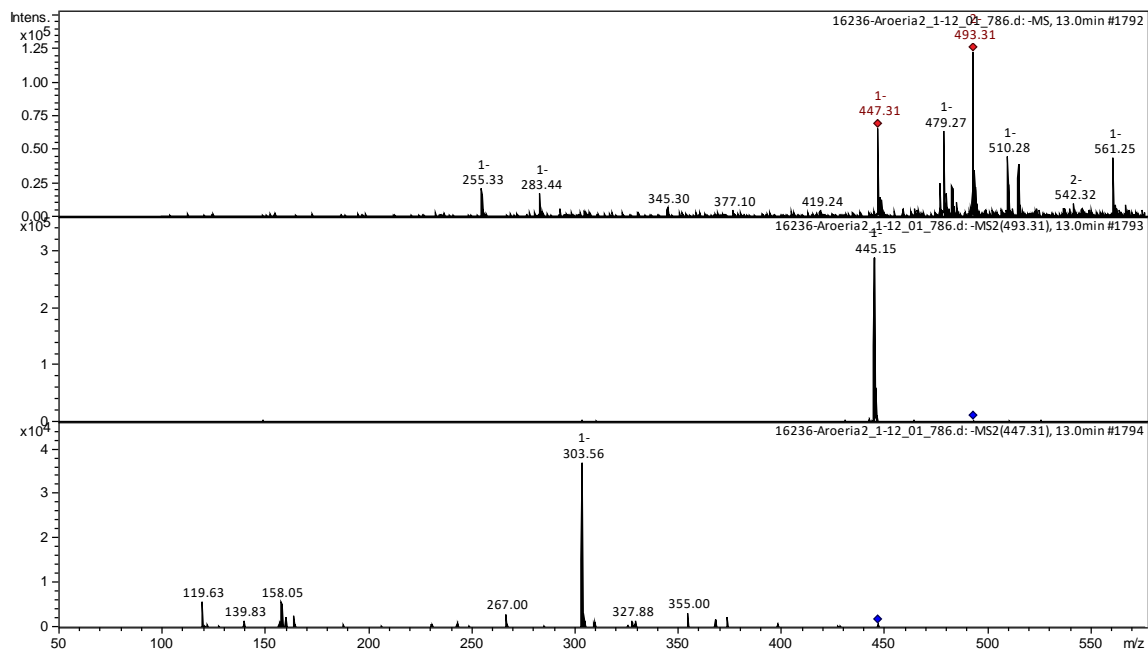


Figura 177: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 13,0 minutos.

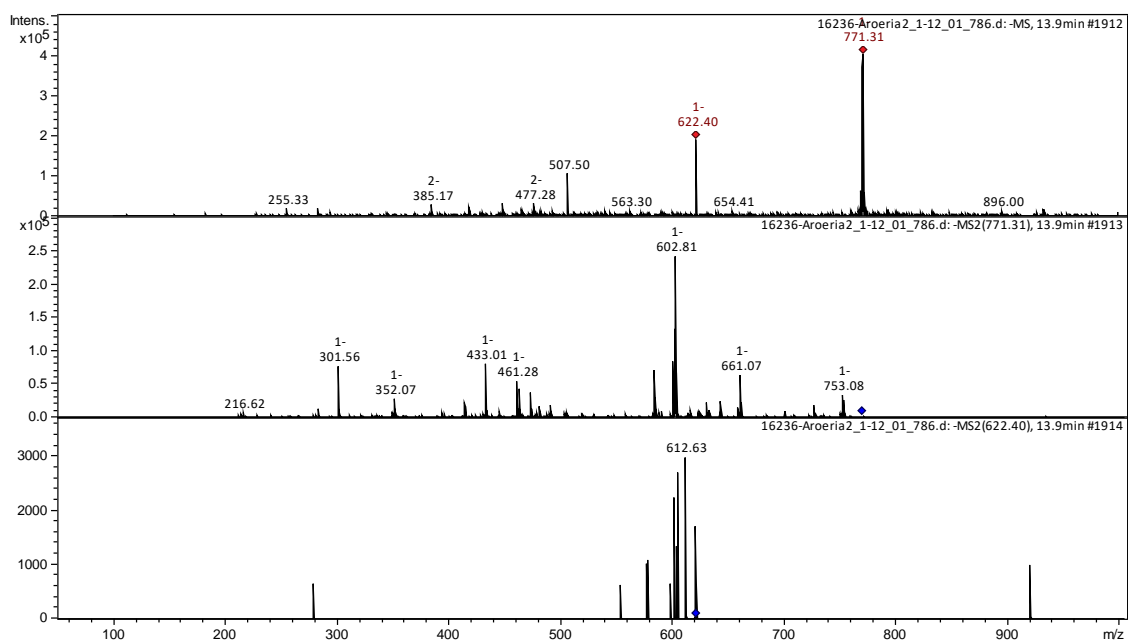


Figura 178: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 13,9 minutos.

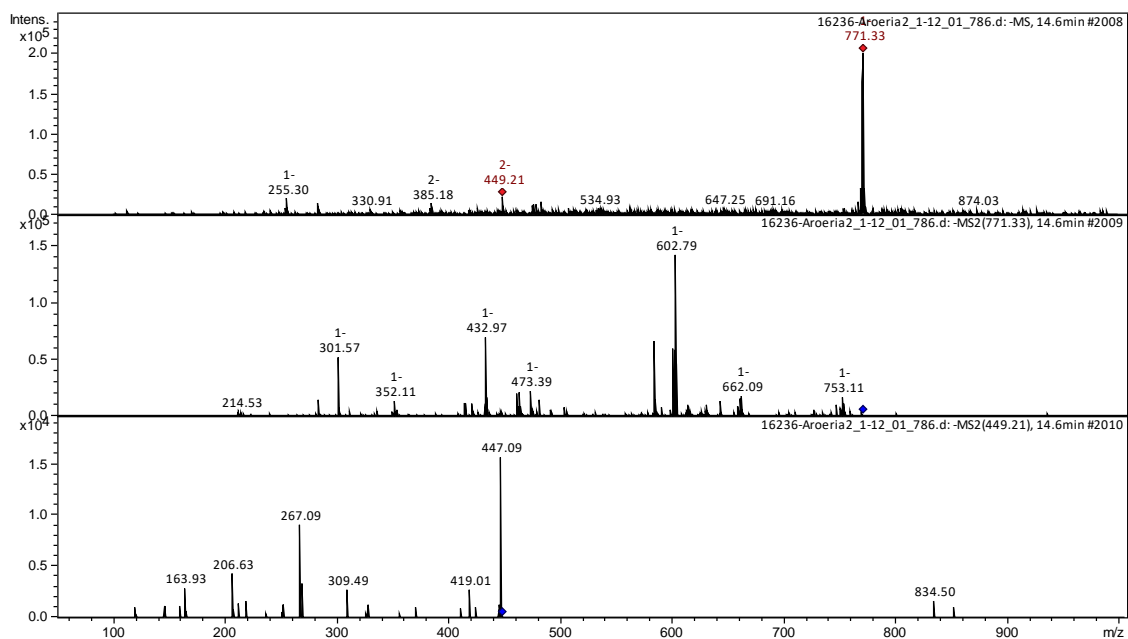


Figura 179: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 14,6 minutos.

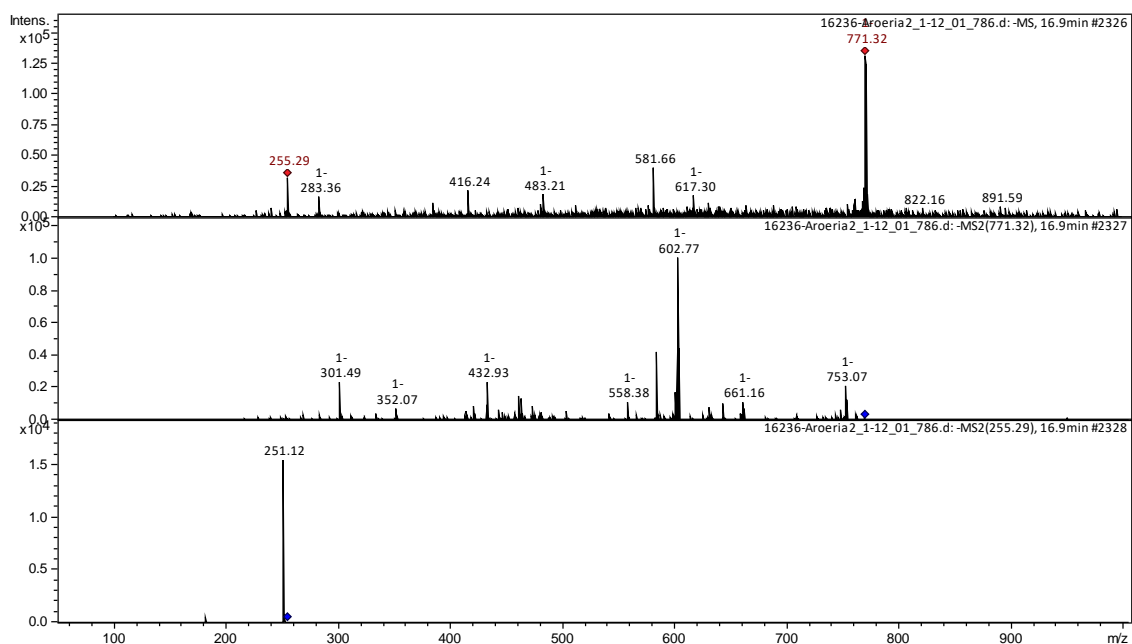


Figura 180: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 16,9 minutos.

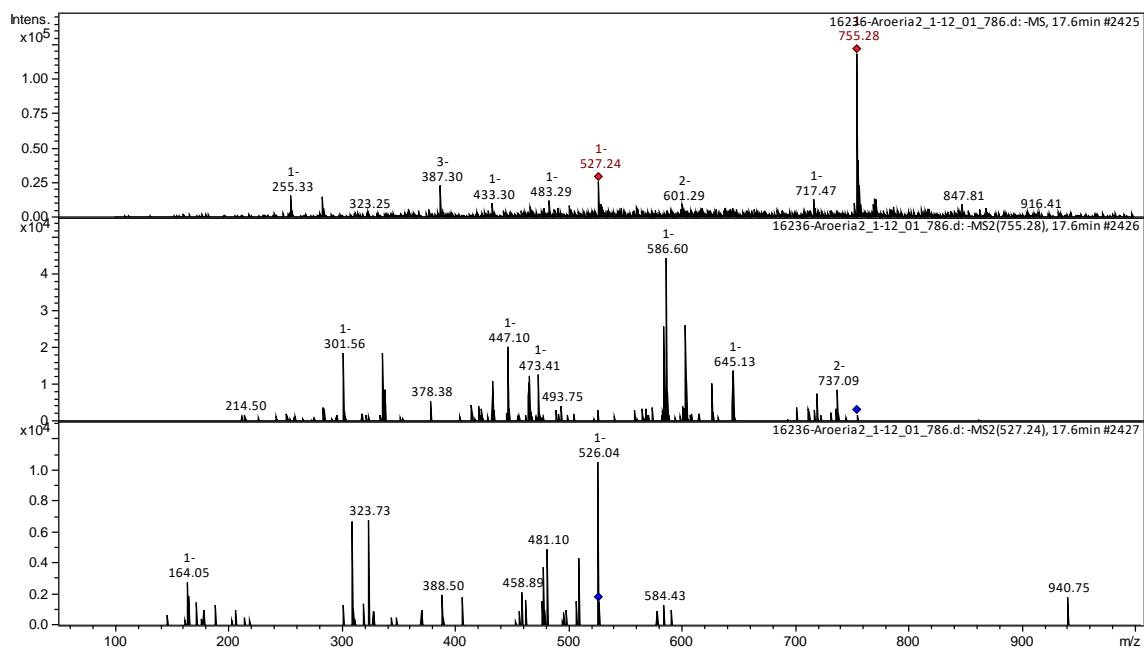


Figura 181 Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 17,6 minutos.

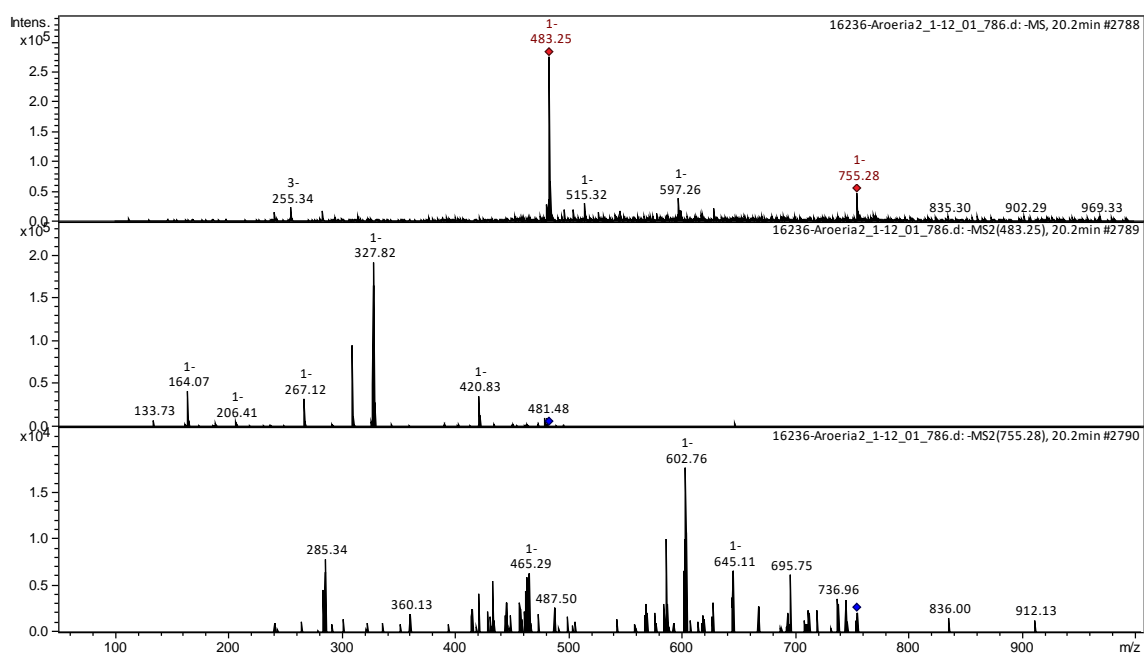


Figura 182: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 20,2 minutos.

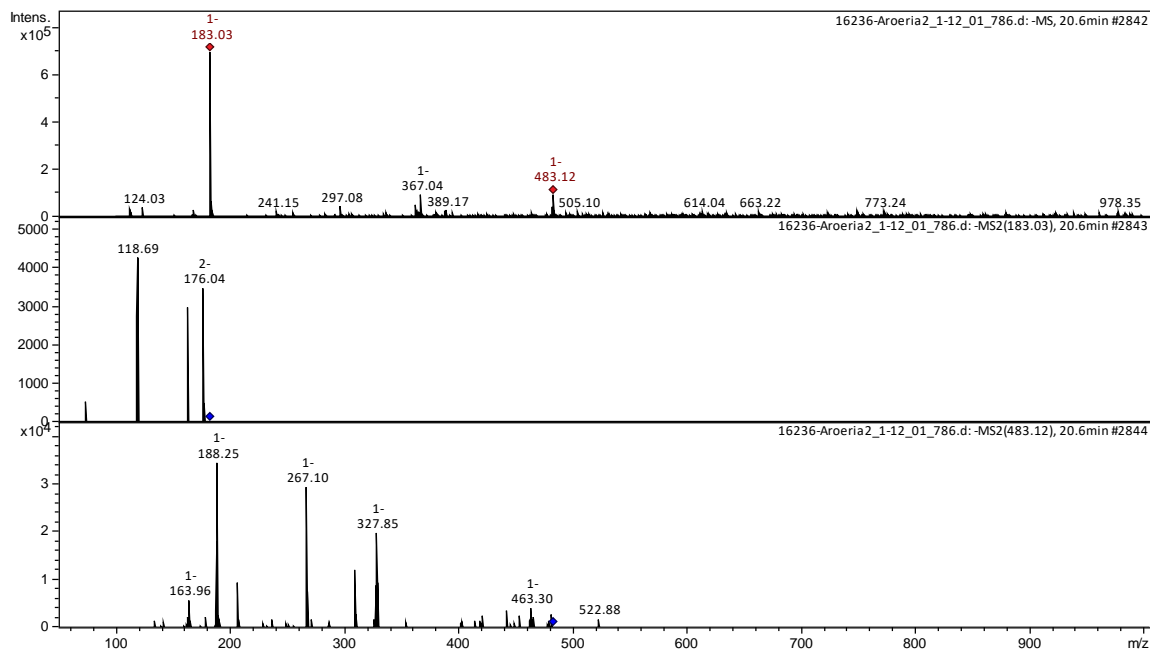


Figura 183: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 20,60 minutos.

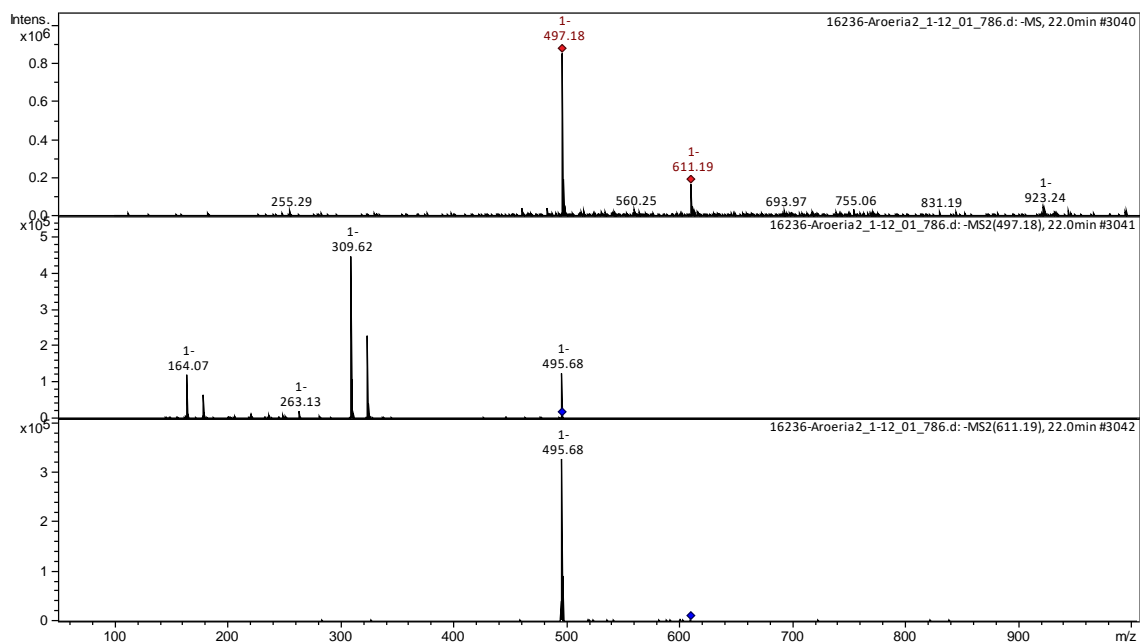


Figura 184: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 22,00 minutos.

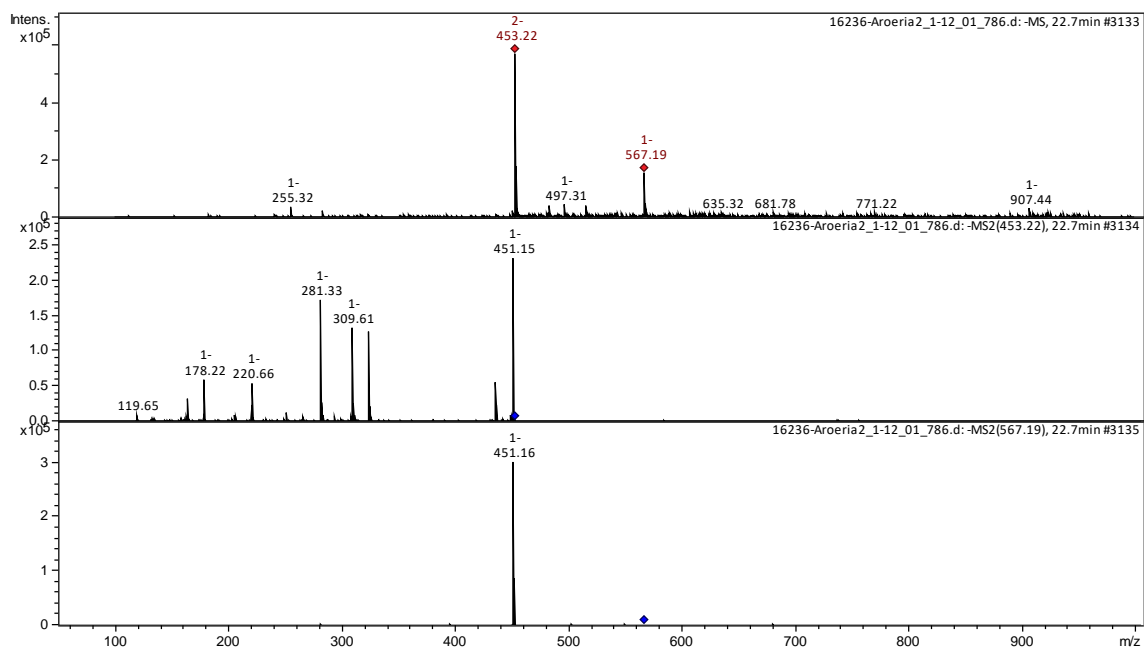


Figura 185: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 22,7 minutos.

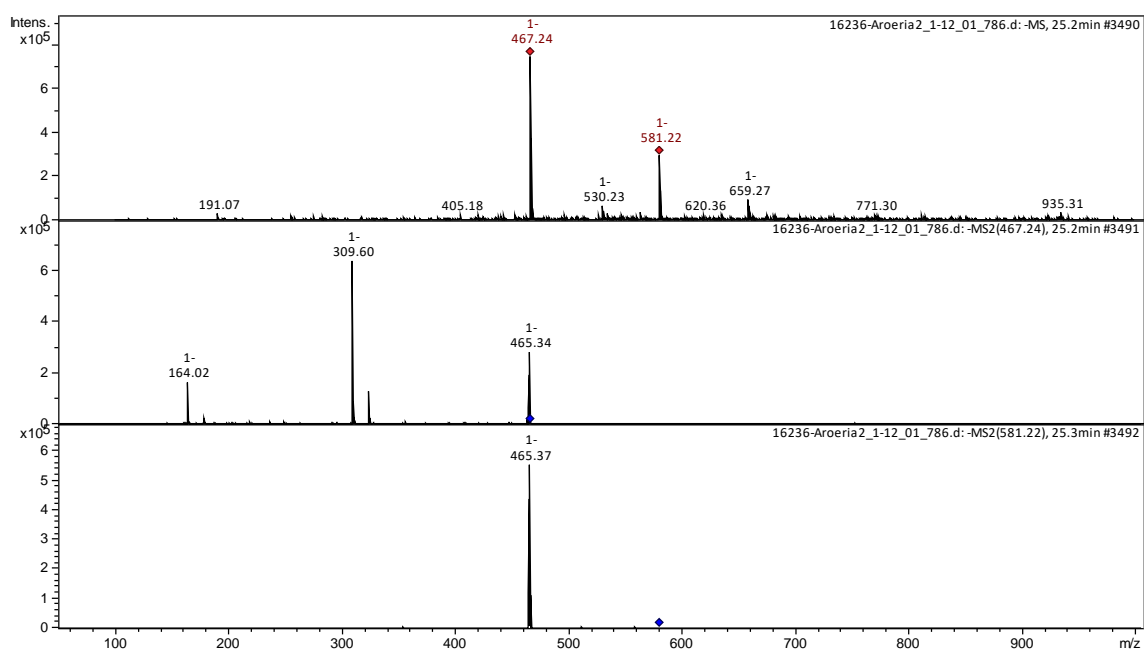


Figura 186: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 25,3 minutos.

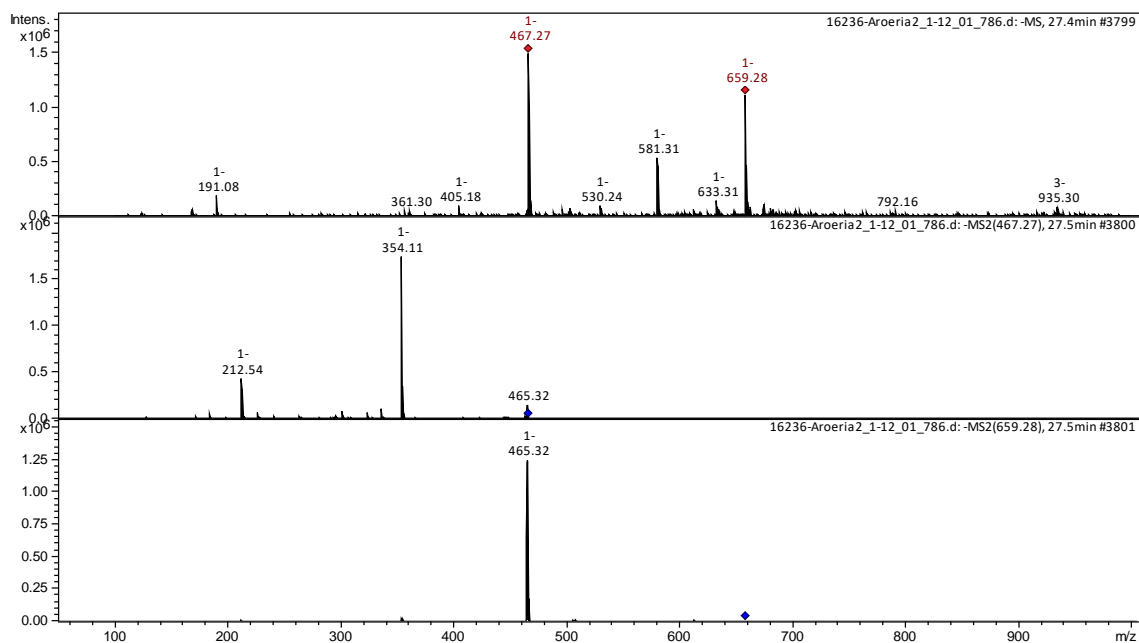


Figura 187: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 27,5 minutos.

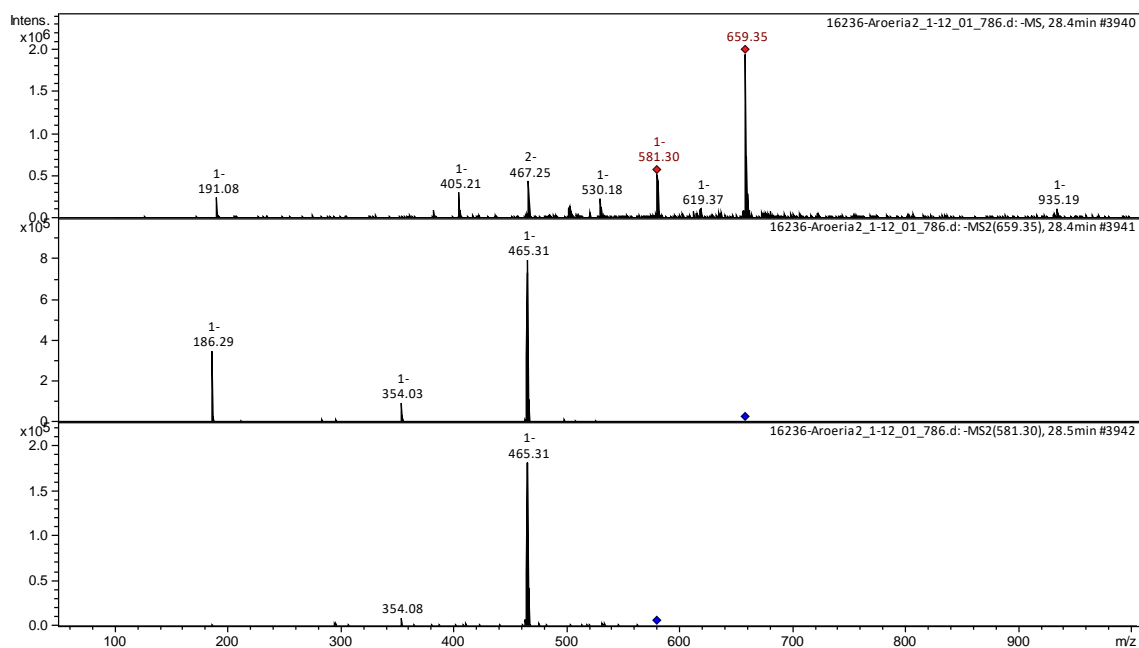


Figura 188: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 28,5 minutos.

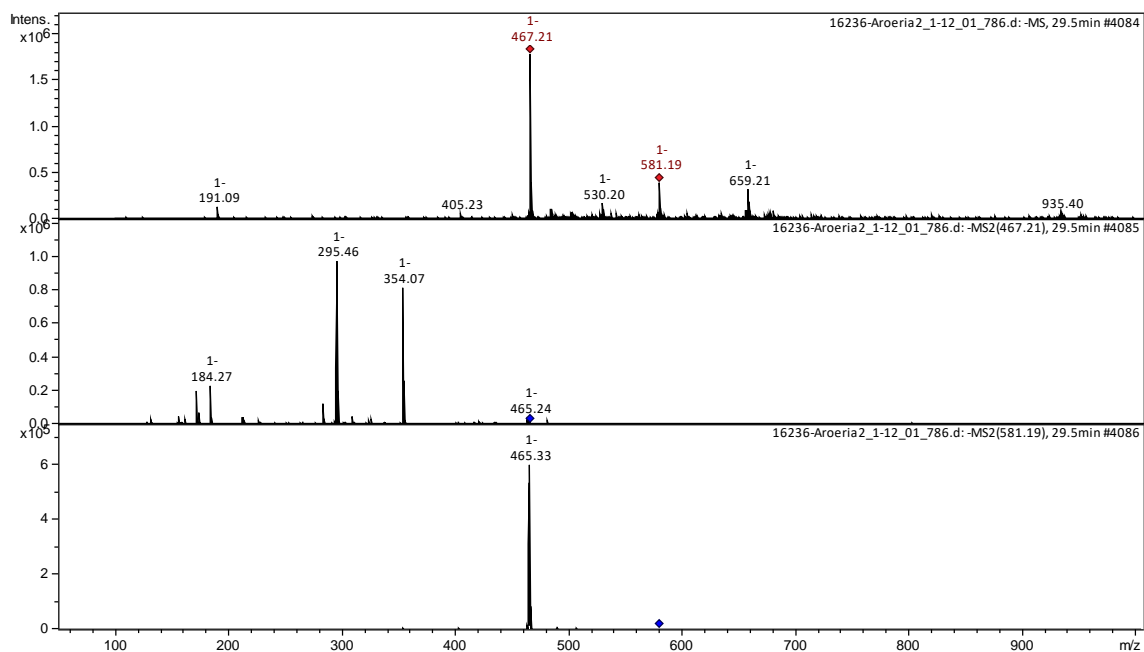


Figura 189: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 29,5 minutos.

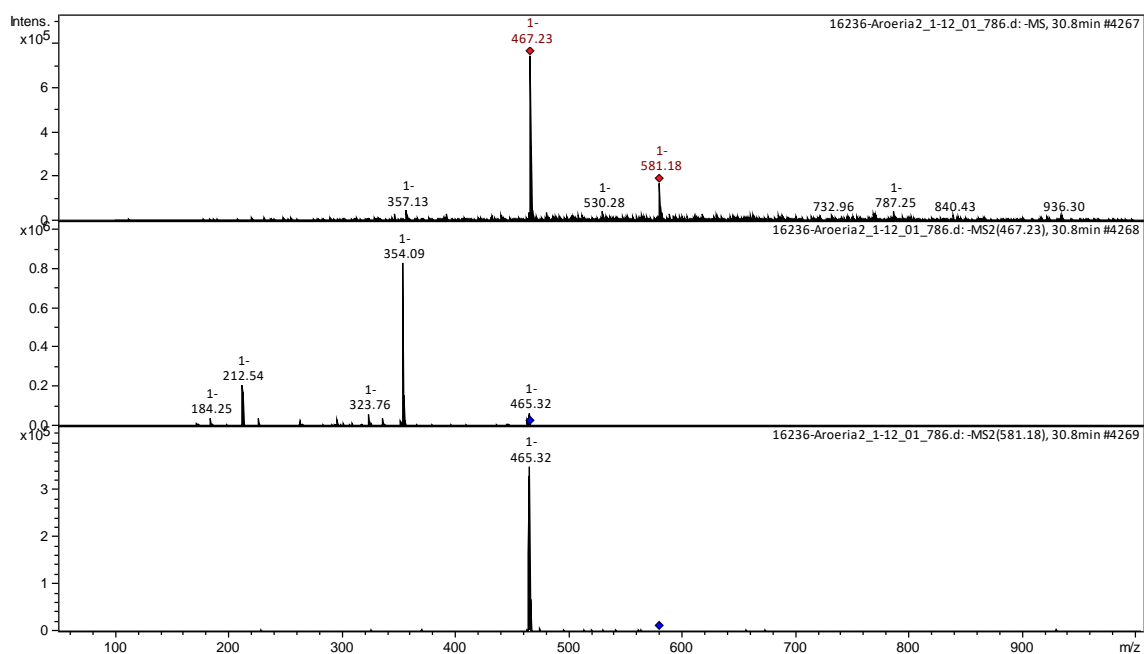


Figura 192: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 30,8 minutos.

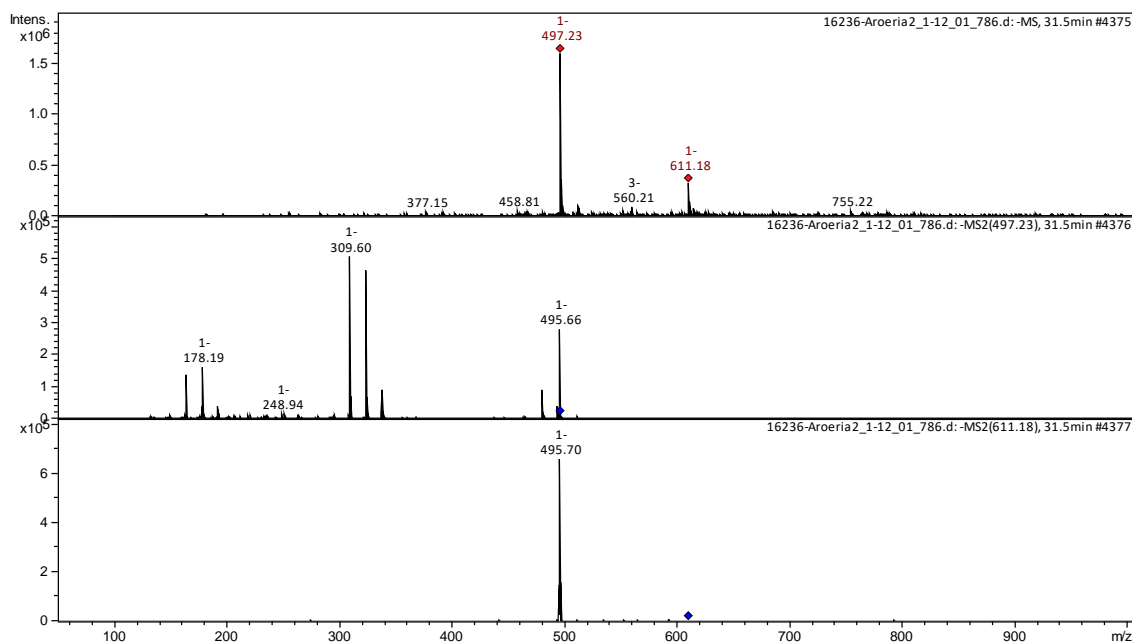


Figura 193: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 31,5 minutos.

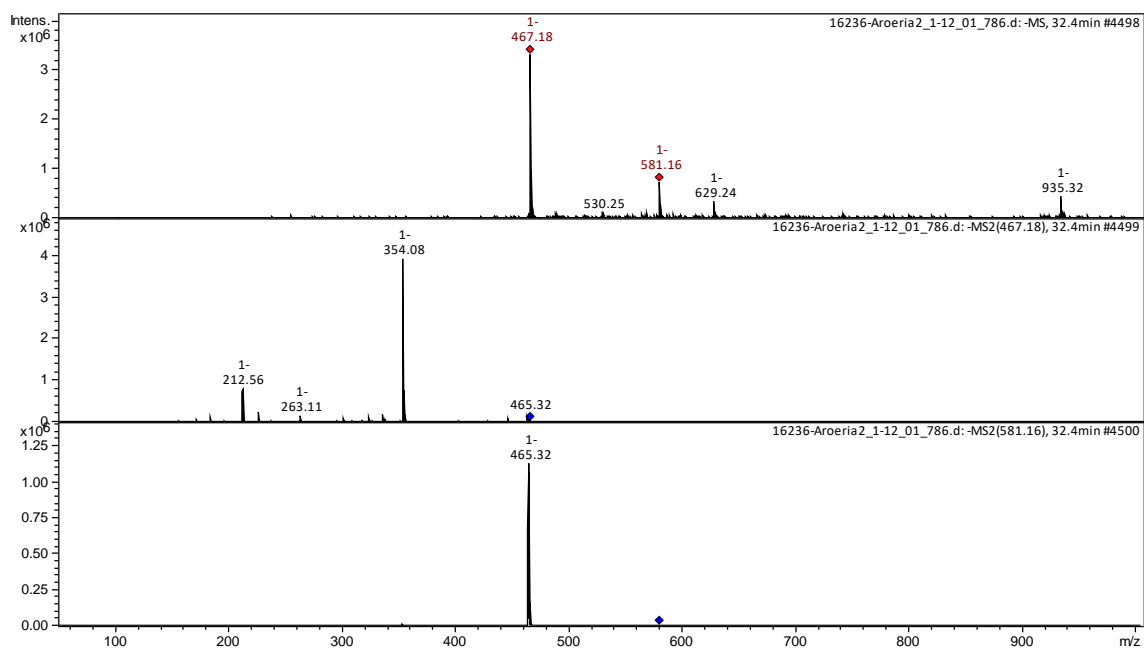


Figura 194: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 32,4 minutos.

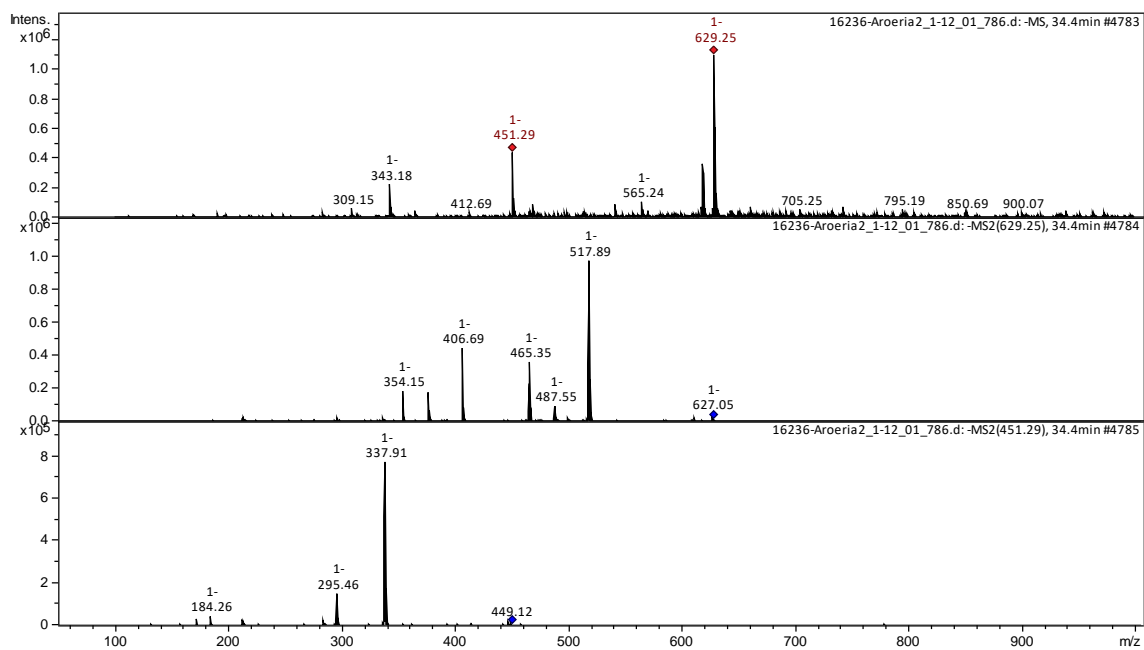


Figura 195: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 34,4 minutos.

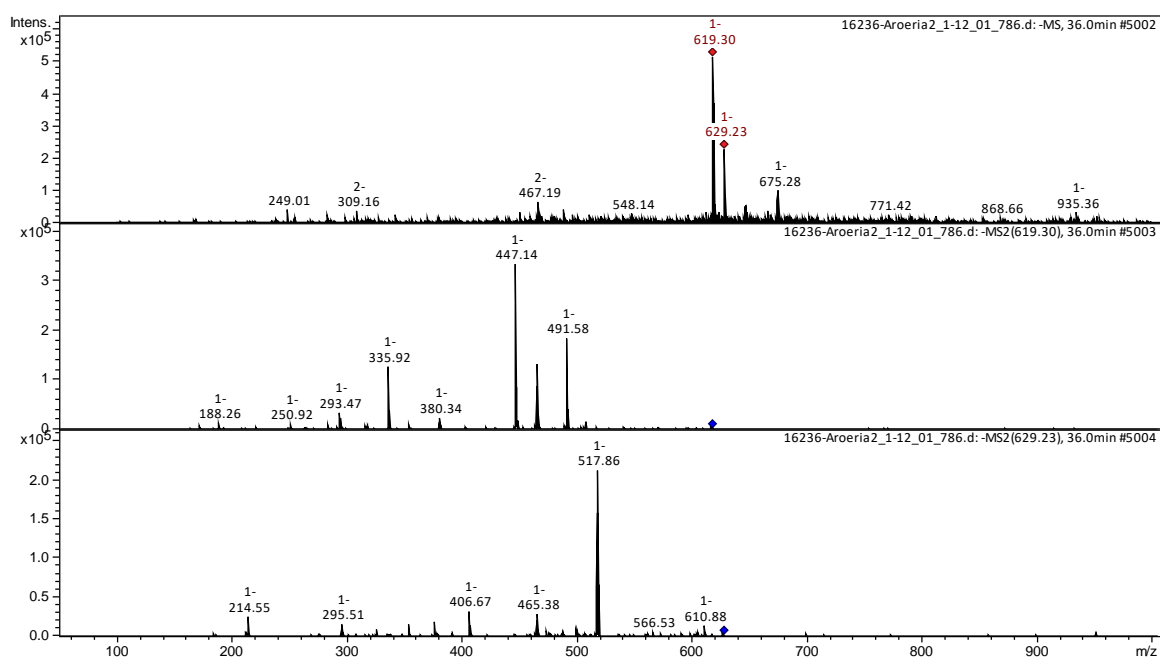


Figura 196: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 36,0 minutos.

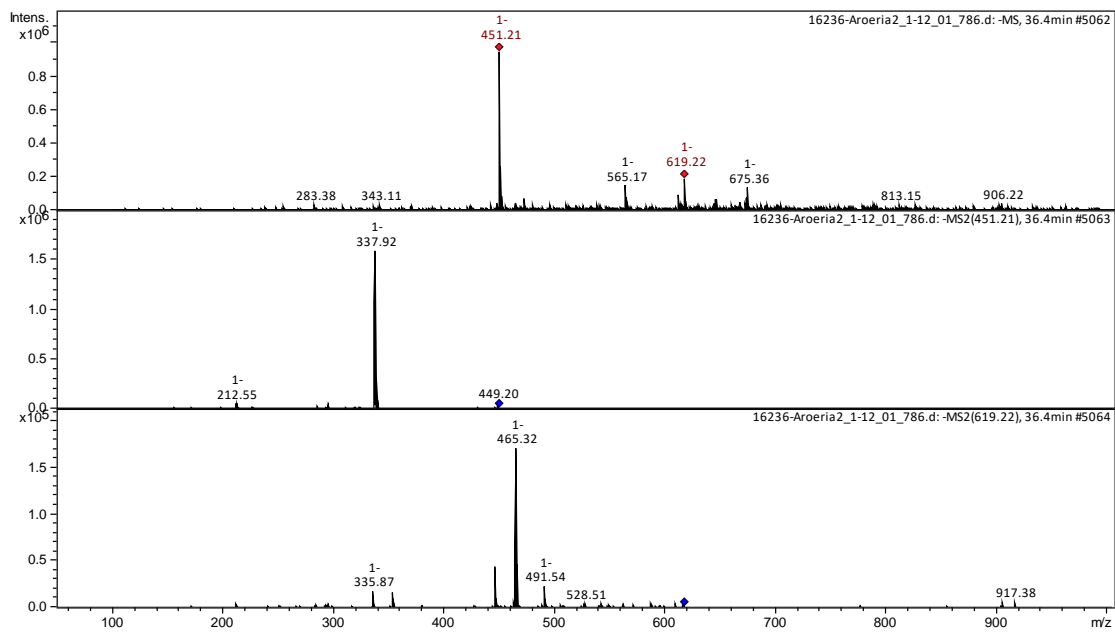


Figura 197: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 36,4 minutos.

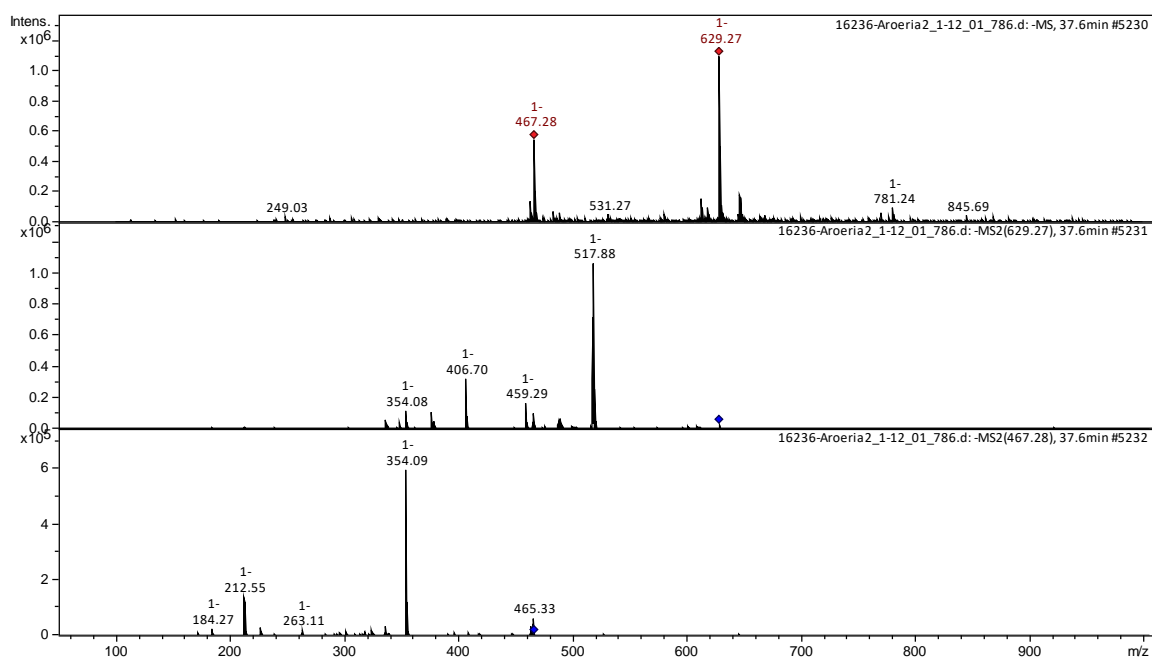


Figura 198: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 37,6 minutos.

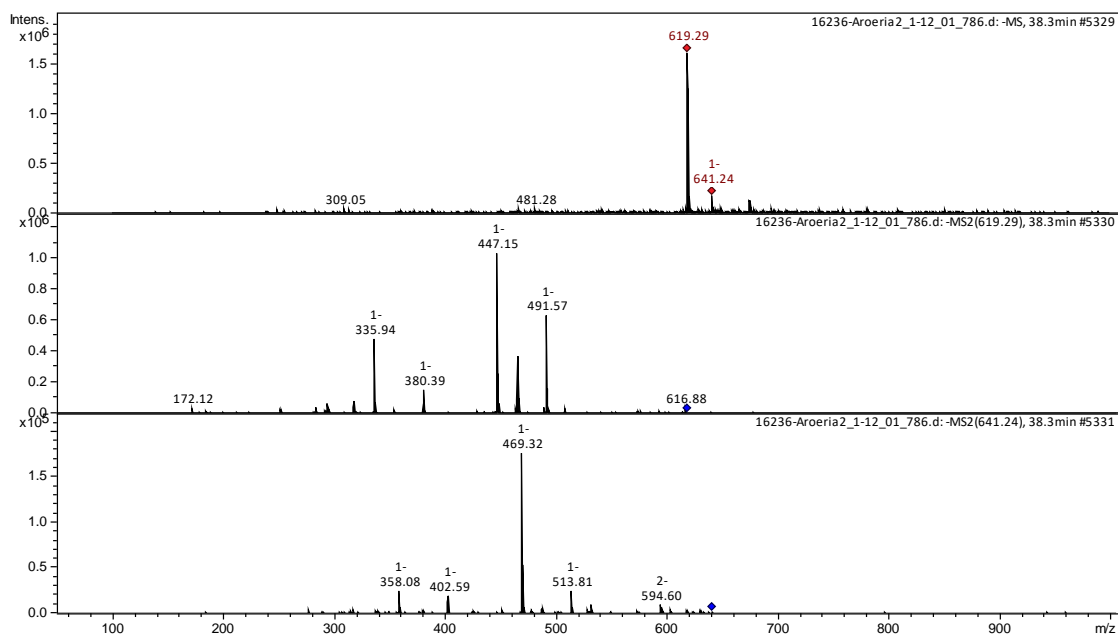


Figura 199: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 38,3 minutos.

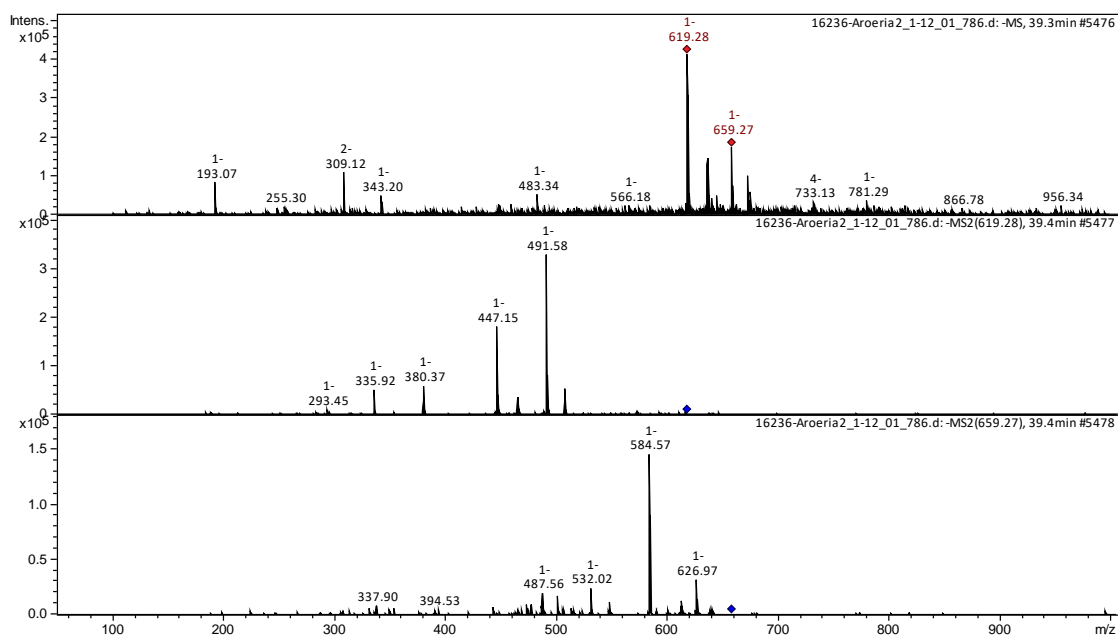


Figura 200: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 39,4 minutos.

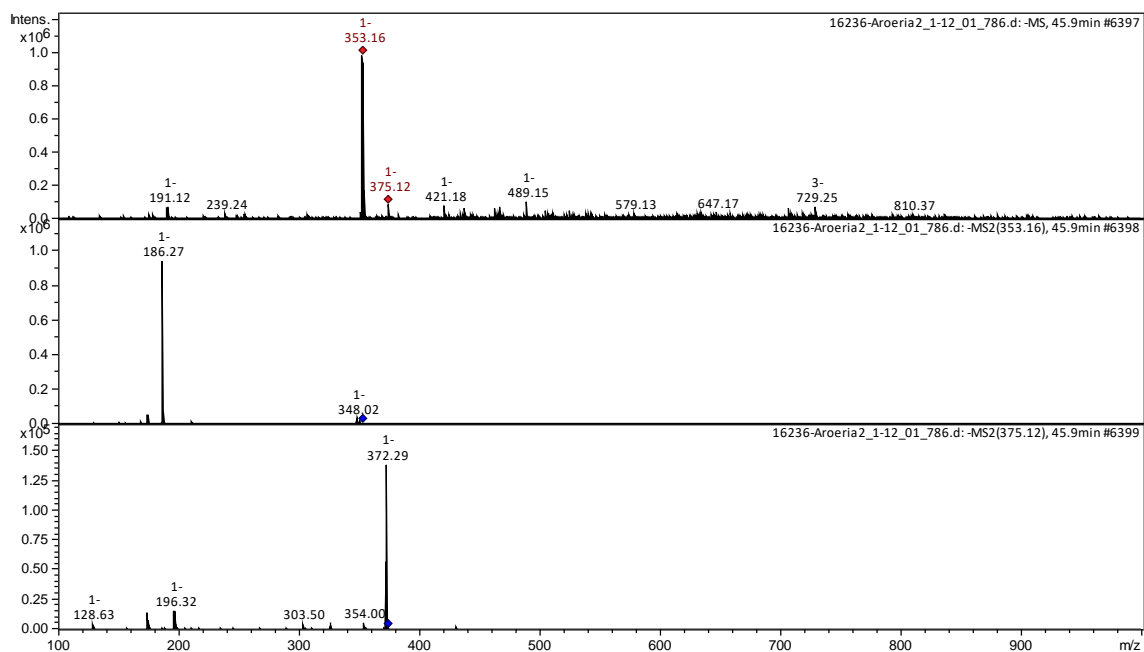


Figura 201: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 45,9 minutos.

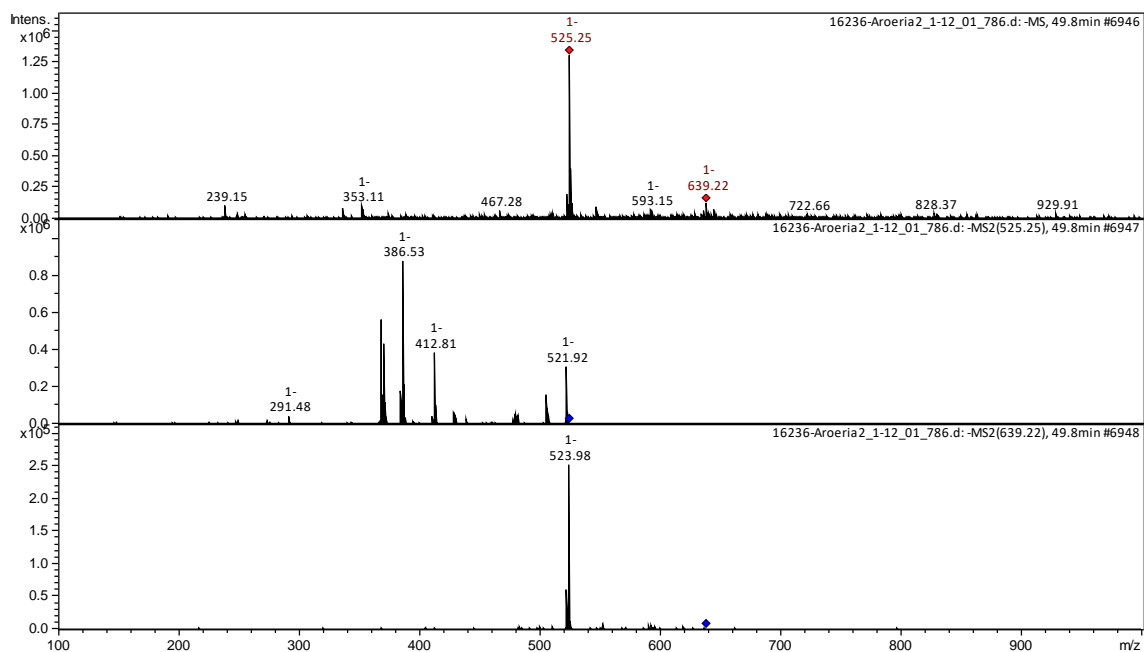


Figura 202: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 49,8 minutos.

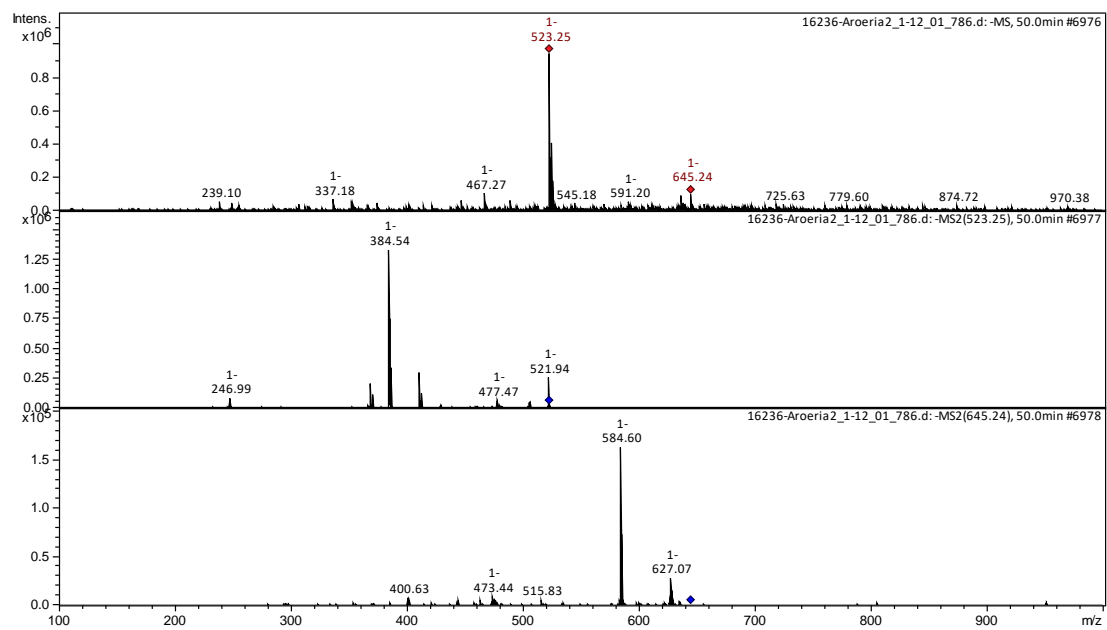


Figura 203: Espectro de massa de *Schinus terebinthifolius* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 50,0 minutos.

12.2 Apêndice B

Espectros de massa de *Rhamnus purshiana* obtido em **Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD**, Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C.

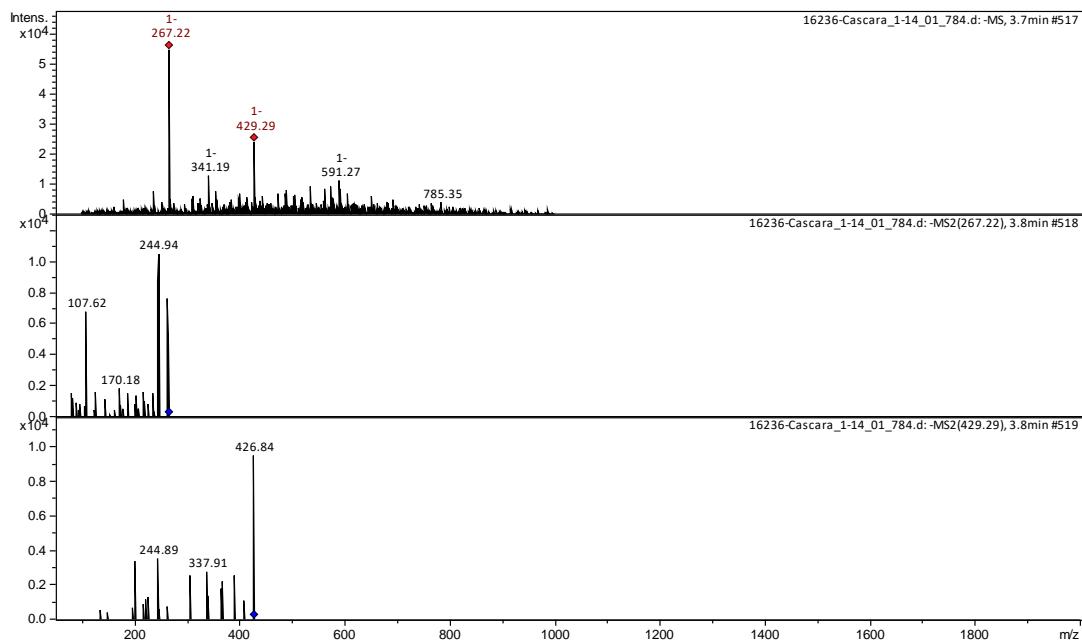


Figura 200: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 14,6 minutos.

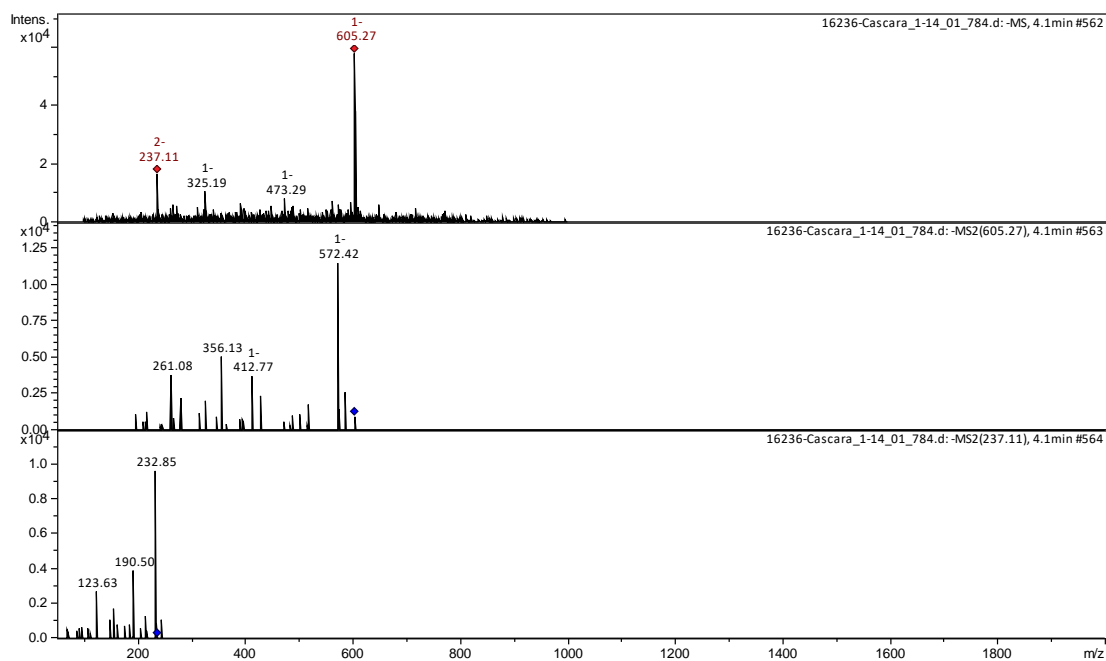


Figura 201: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,1 minutos.

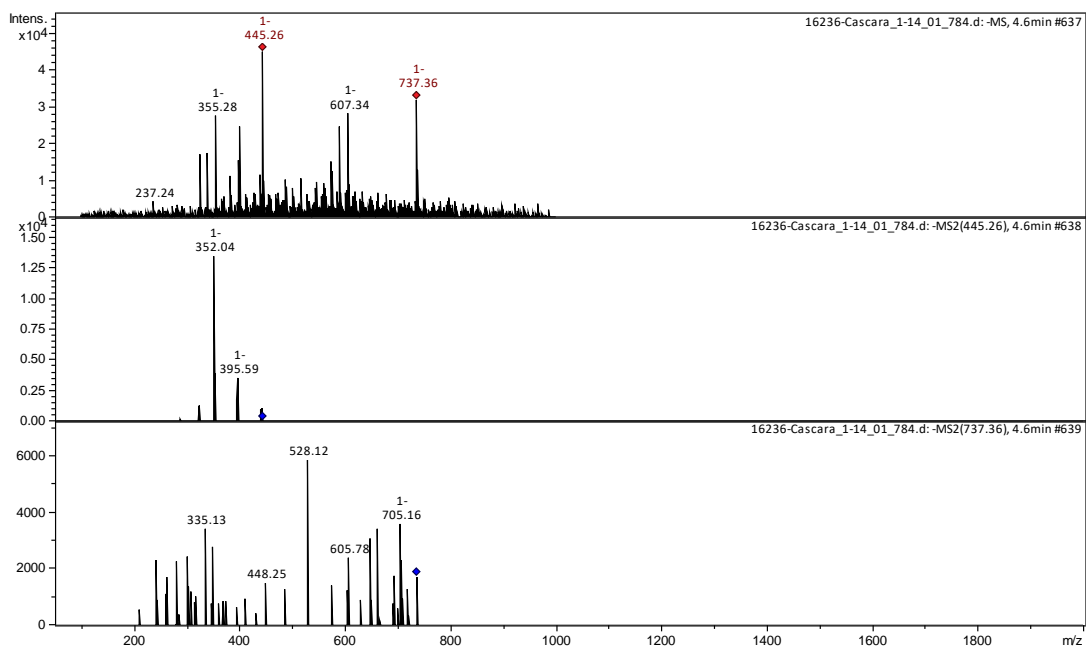


Figura 202: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,6 minutos.

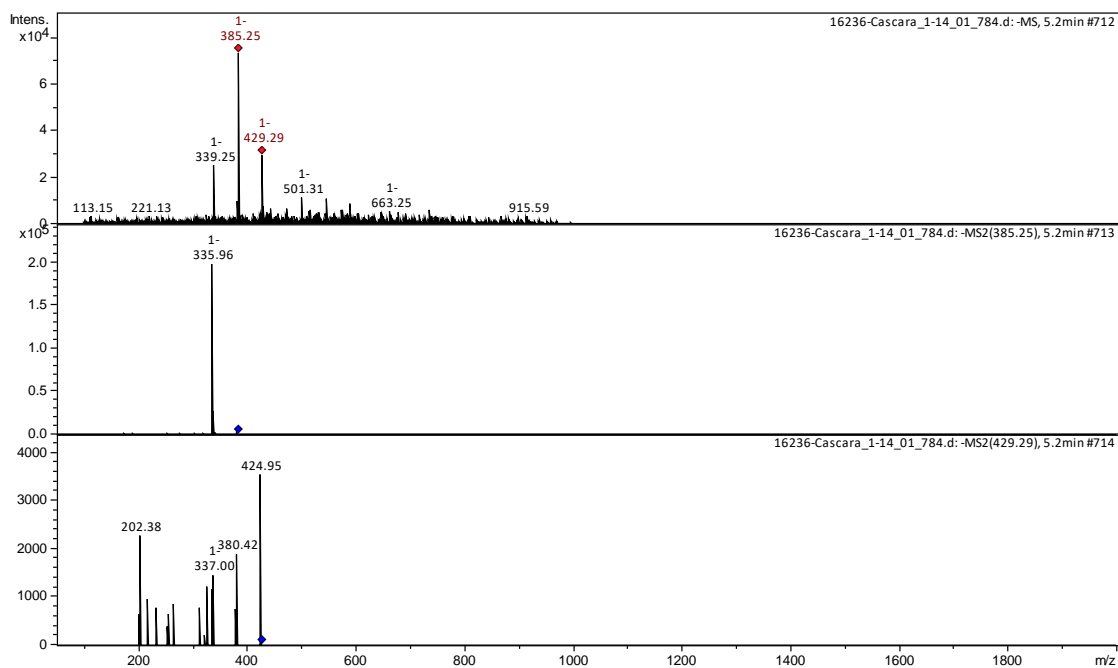


Figura 203: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 5,2 minutos.

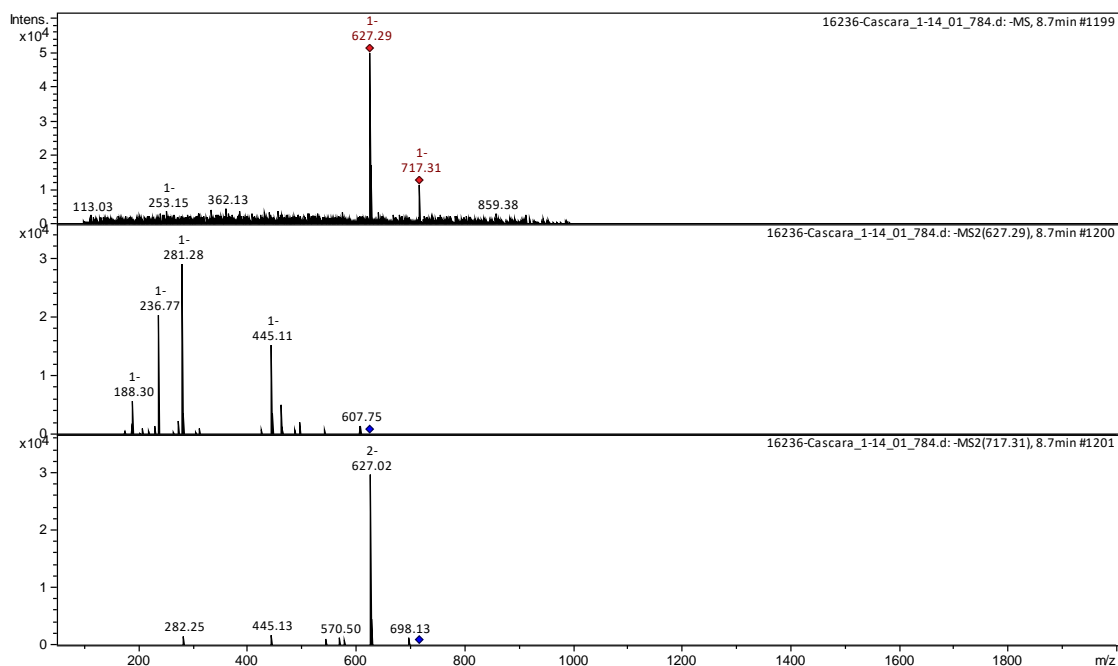


Figura 204: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 8,7 minutos.

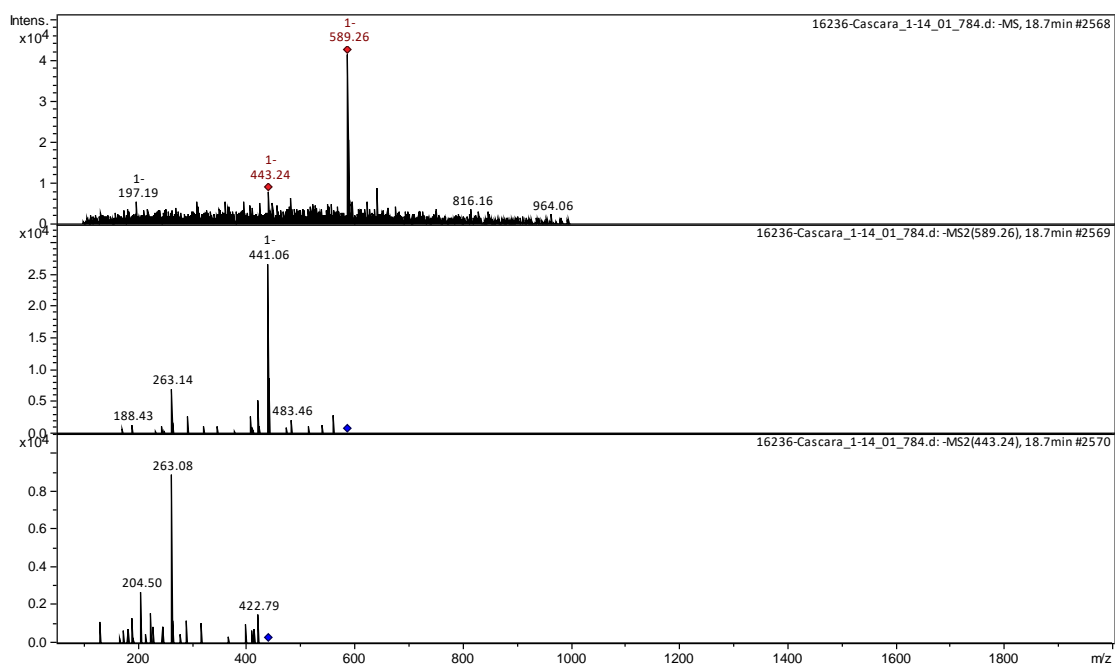


Figura 205: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 18,7 minutos.

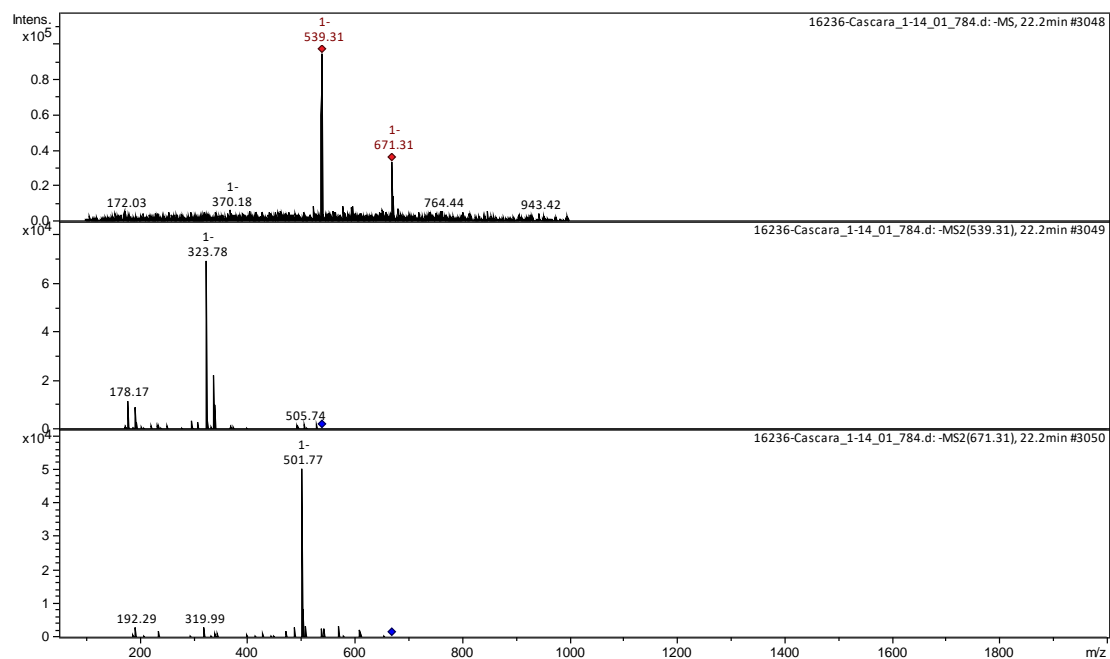


Figura 206: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 22,2 minutos.

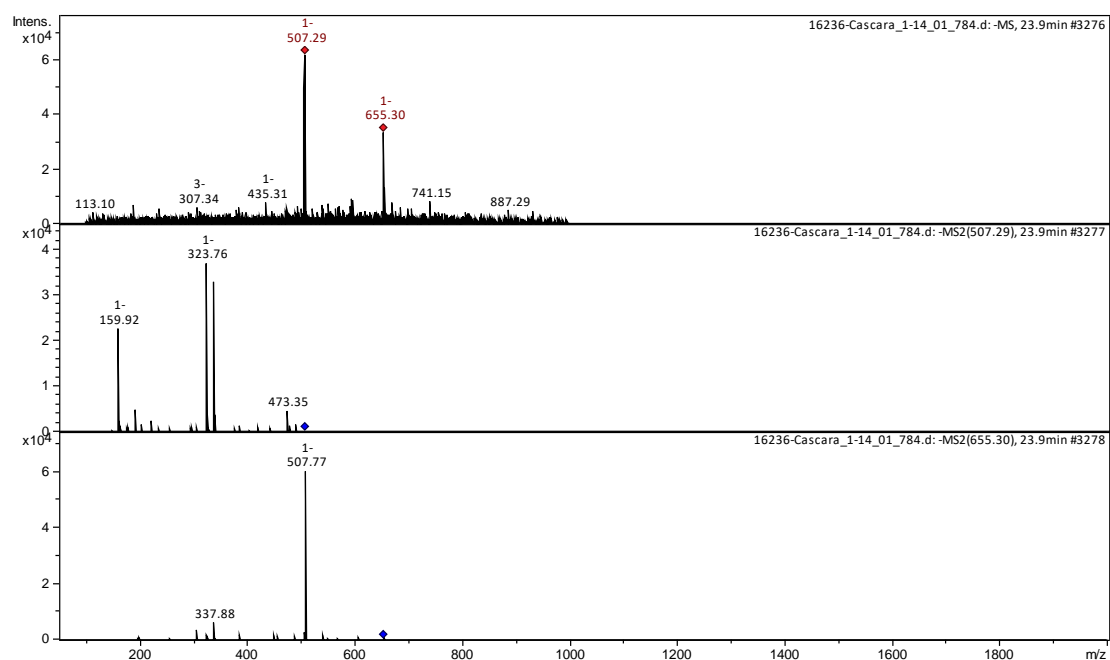


Figura 207: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 23,90 minutos.

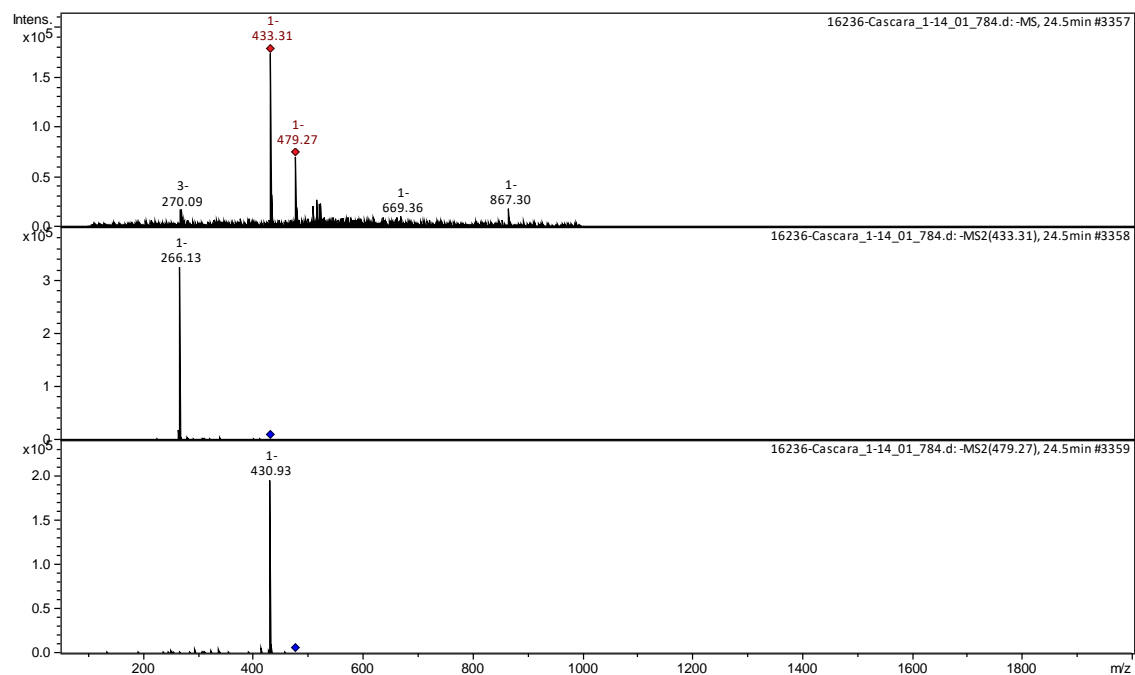


Figura 208: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 24,5 minutos.

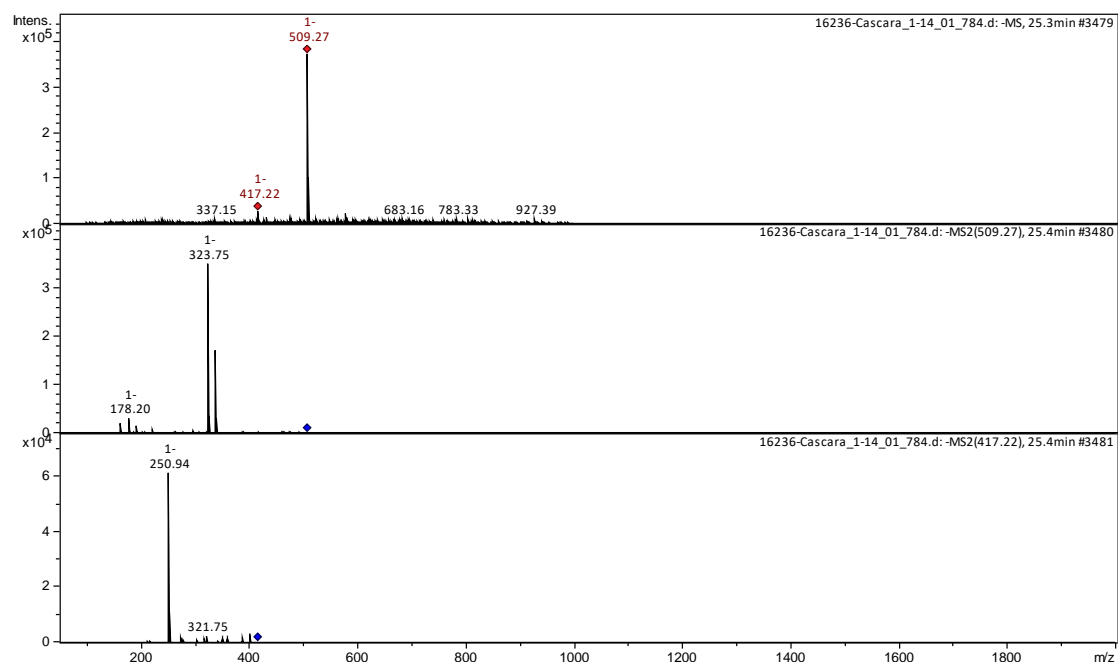


Figura 209: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 25,4 minutos.

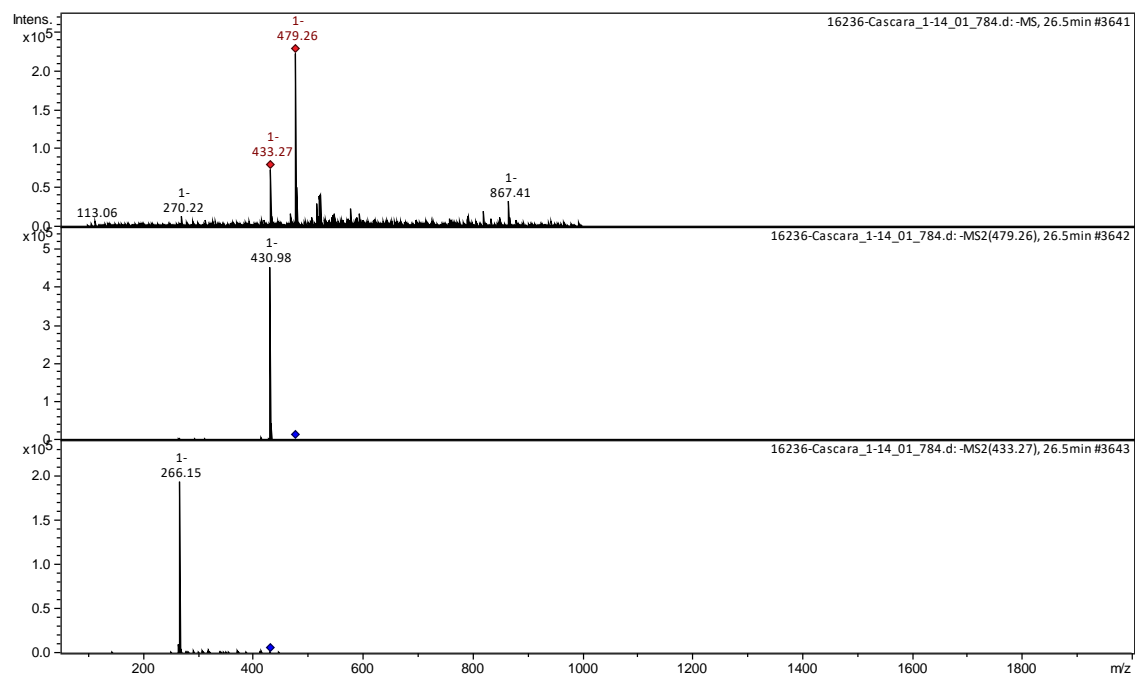


Figura 210: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 26,5 minutos.

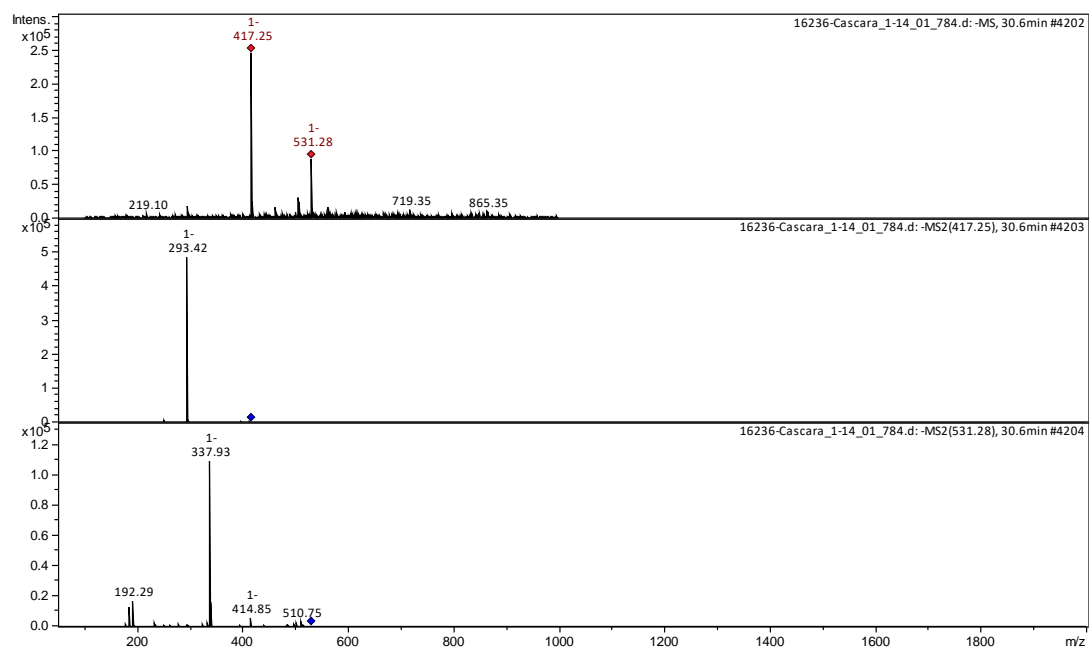


Figura 211: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 30,6 minutos.

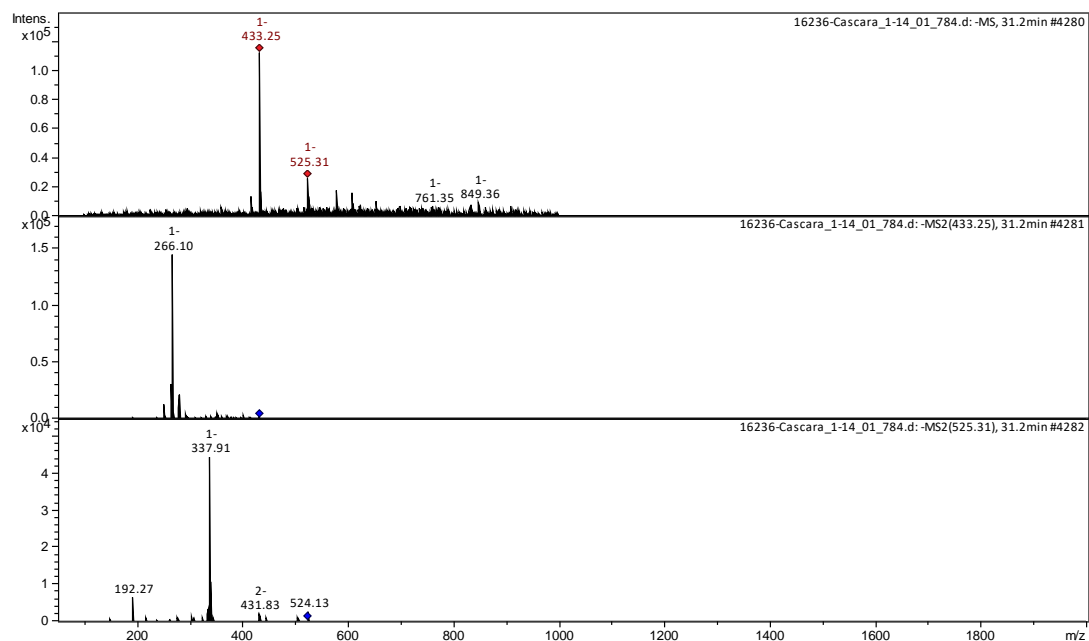


Figura 212: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 31,2 minutos.

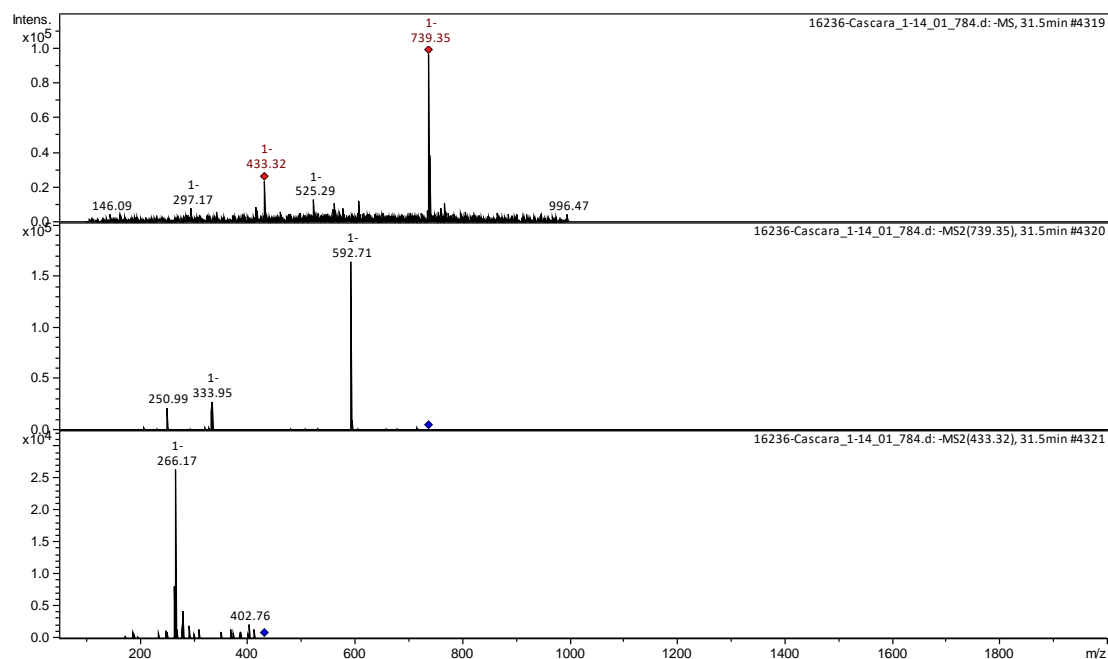


Figura 213: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 31,5 minutos.

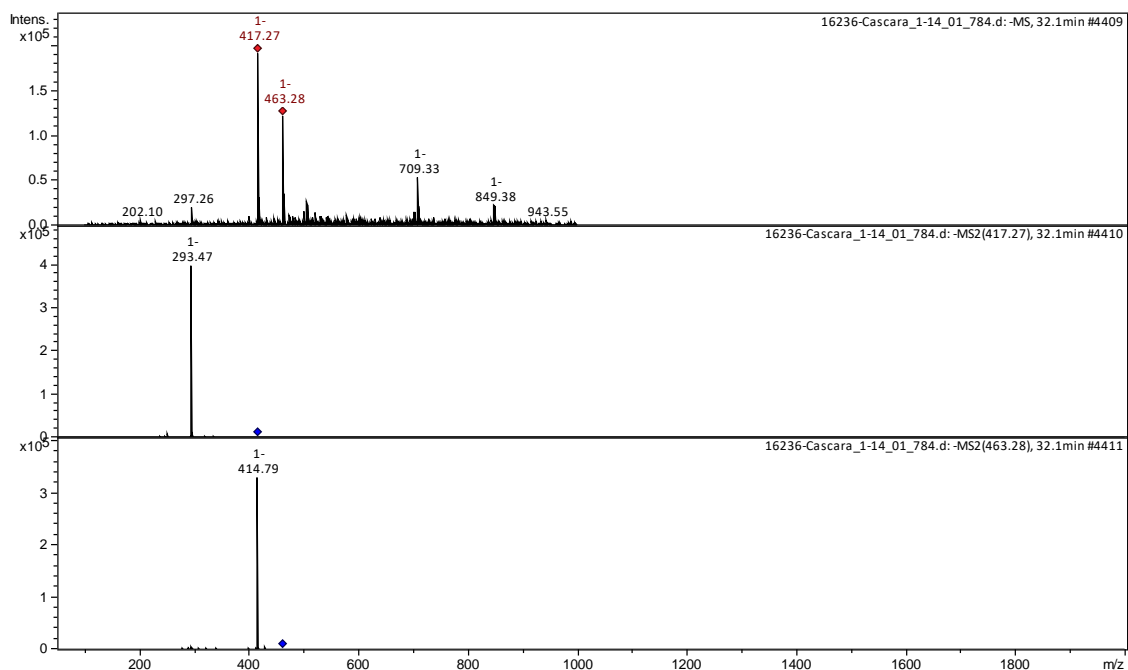


Figura 214: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 32,10 minutos.

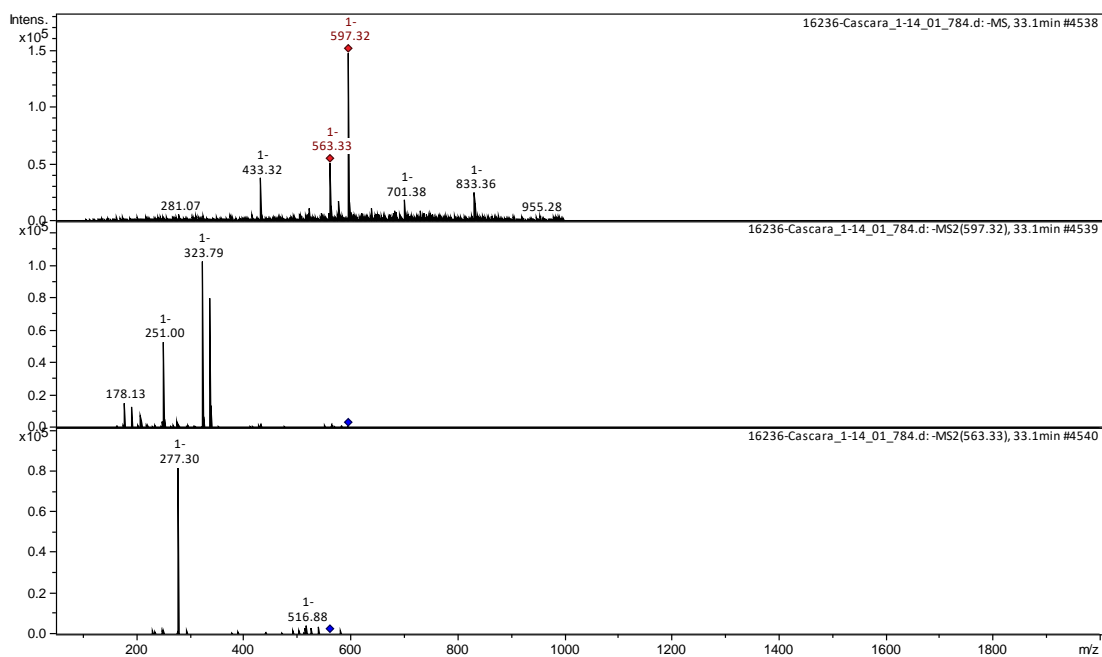


Figura 215: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 33,1 minutos.

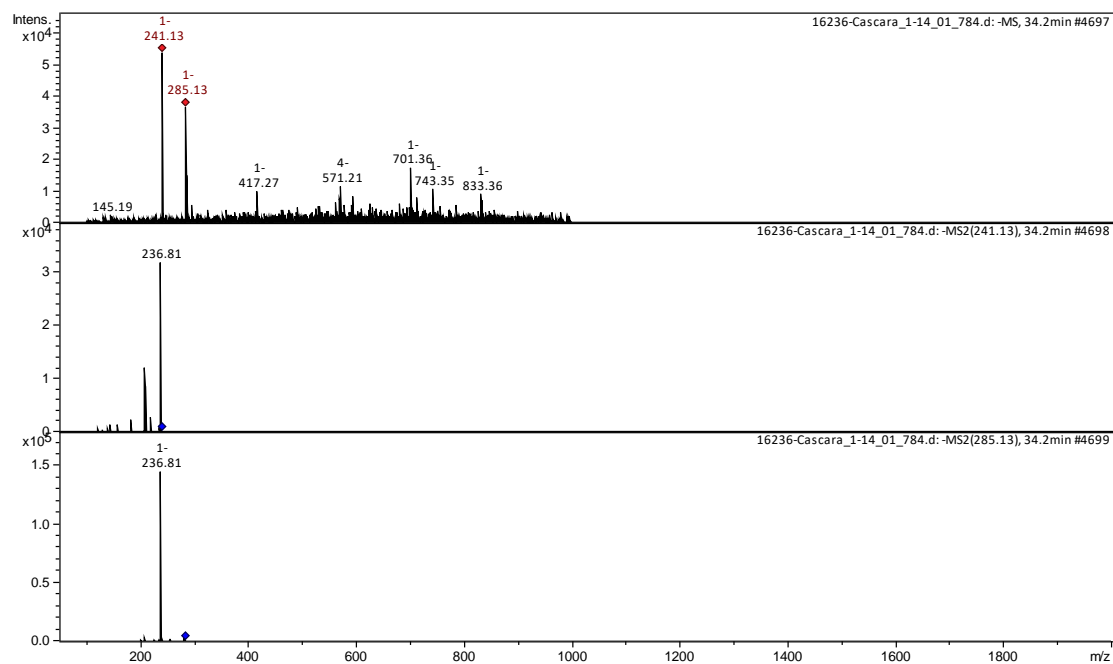


Figura 216: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 34,2 minutos.

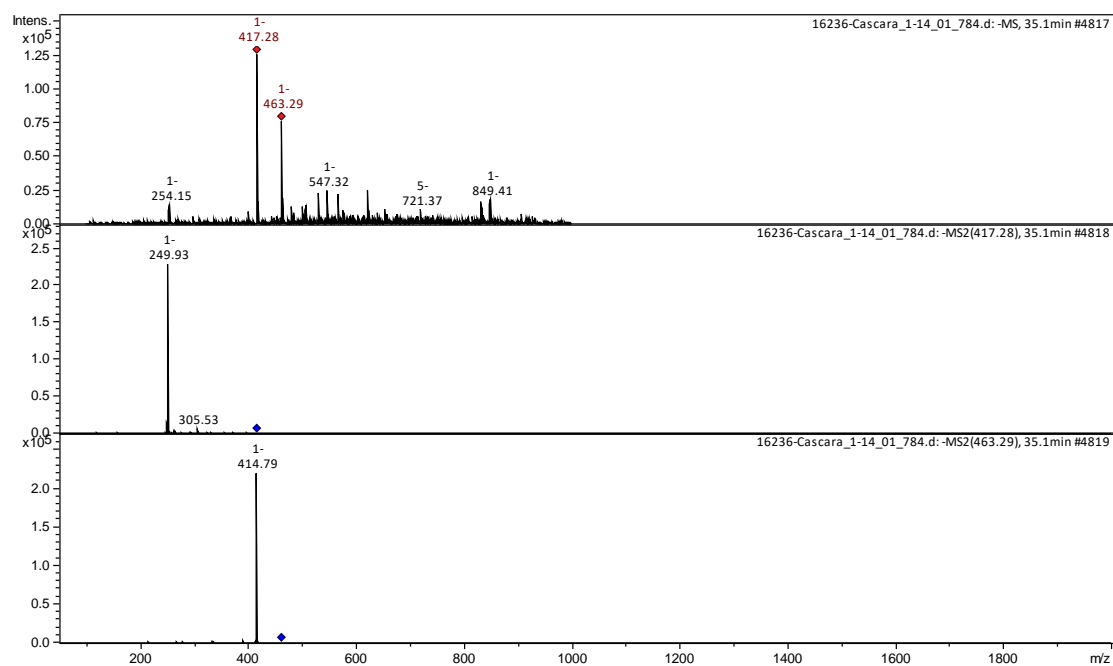


Figura 217: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 35,1 minutos.

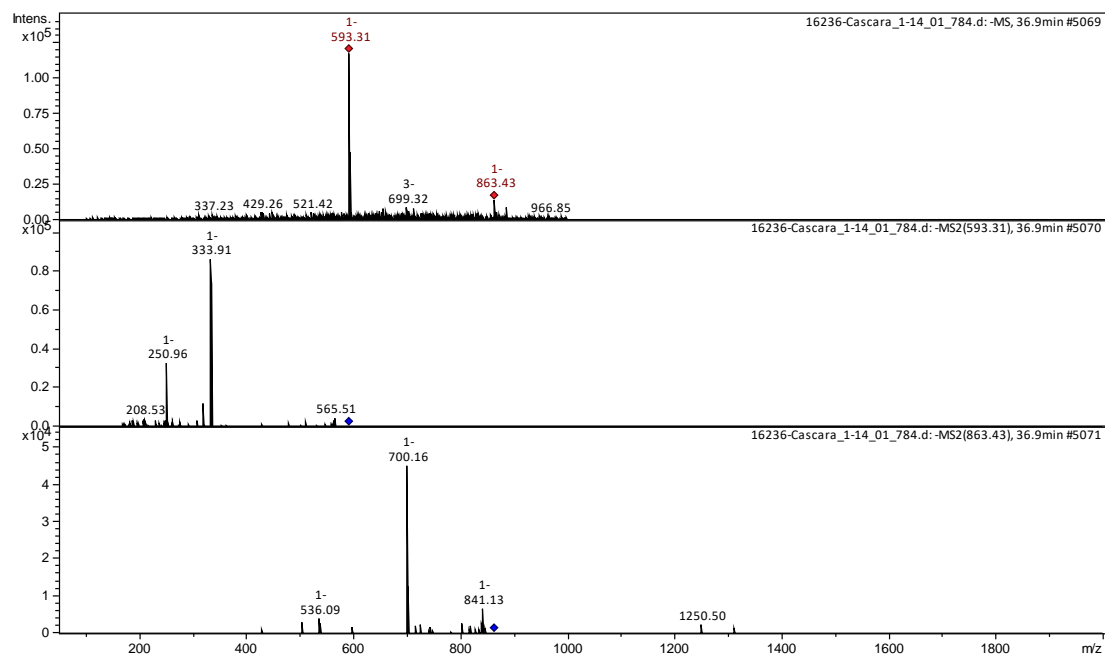


Figura 218: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 36,9 minutos.

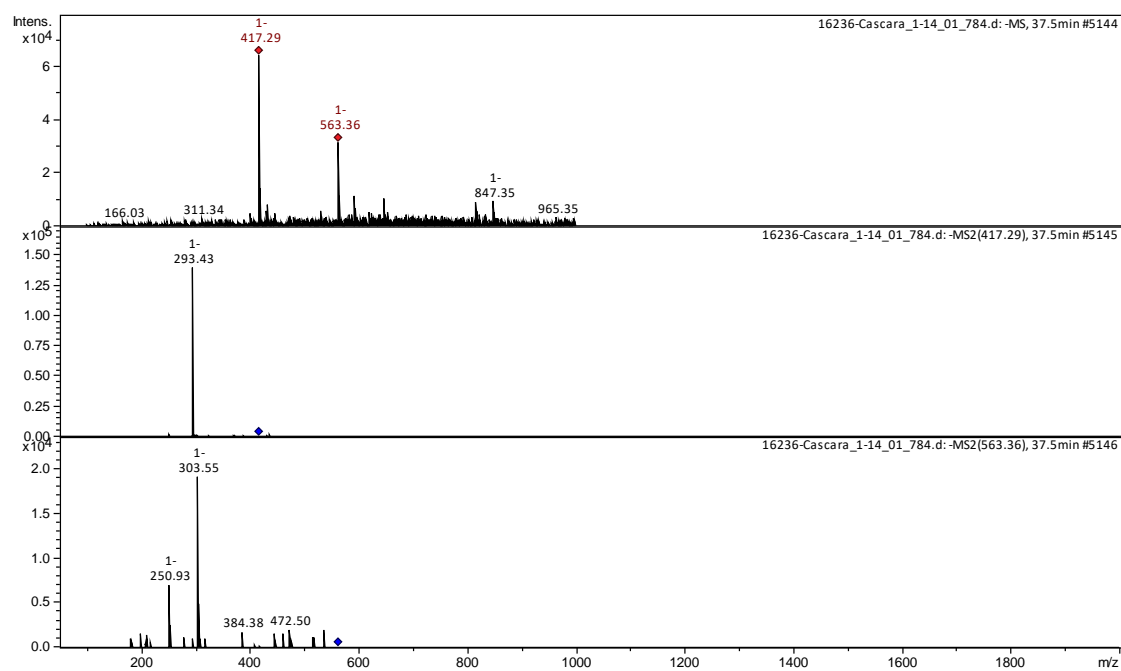


Figura 219: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 37,50 minutos.

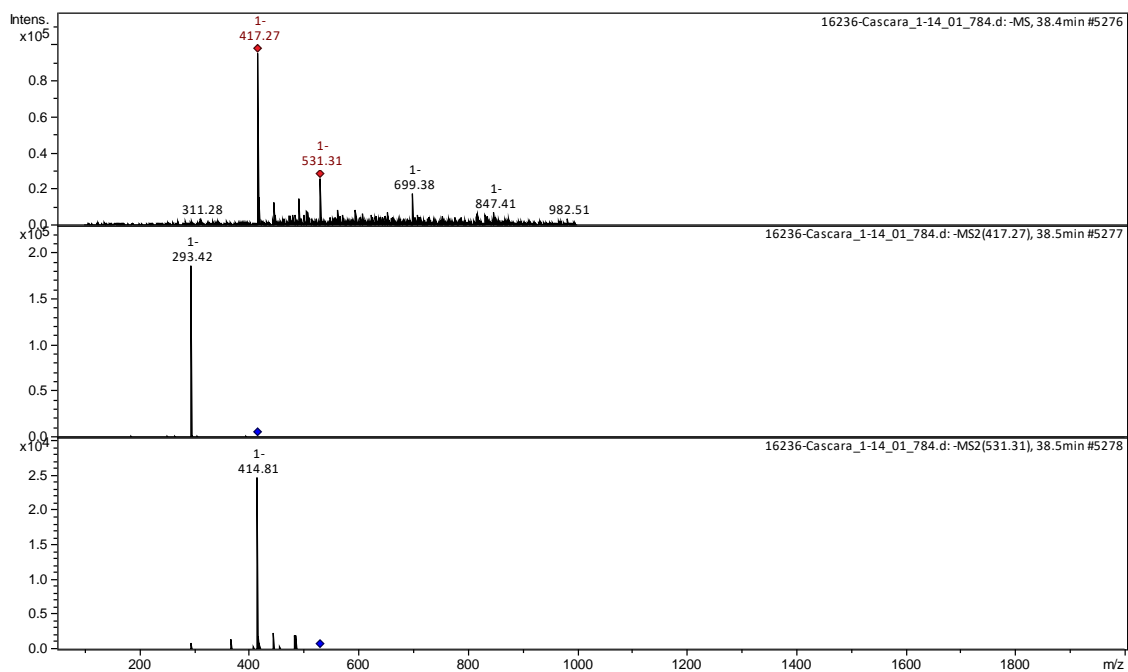


Figura 220: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 38,5 minutos.

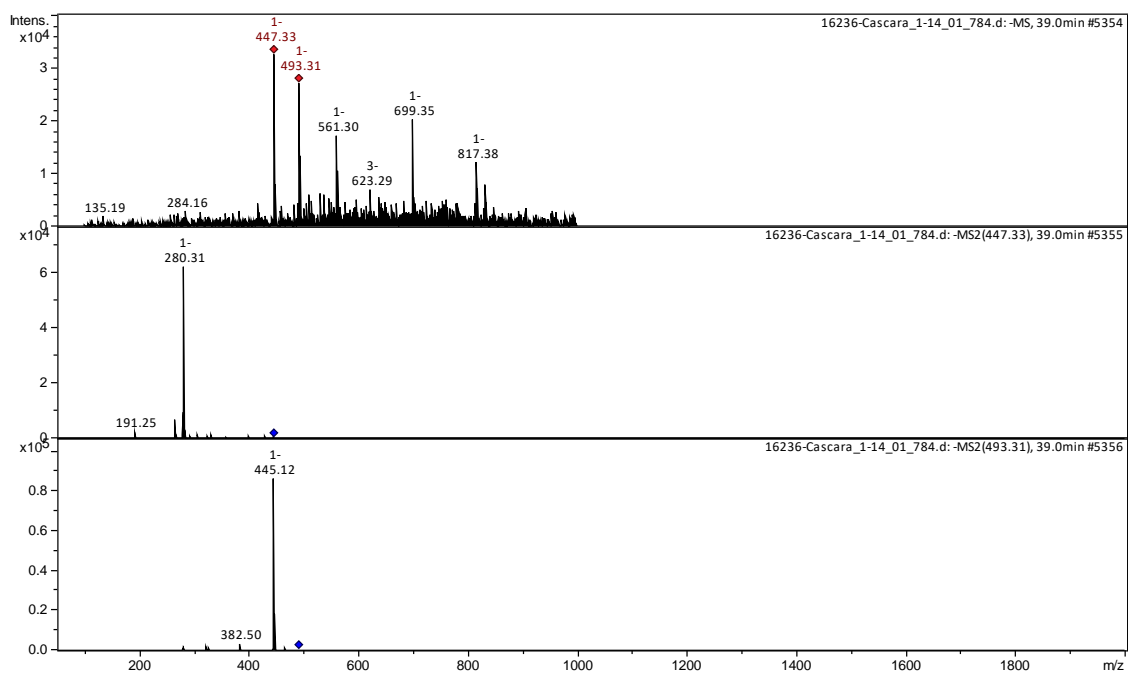


Figura 221: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 39,0 minutos.

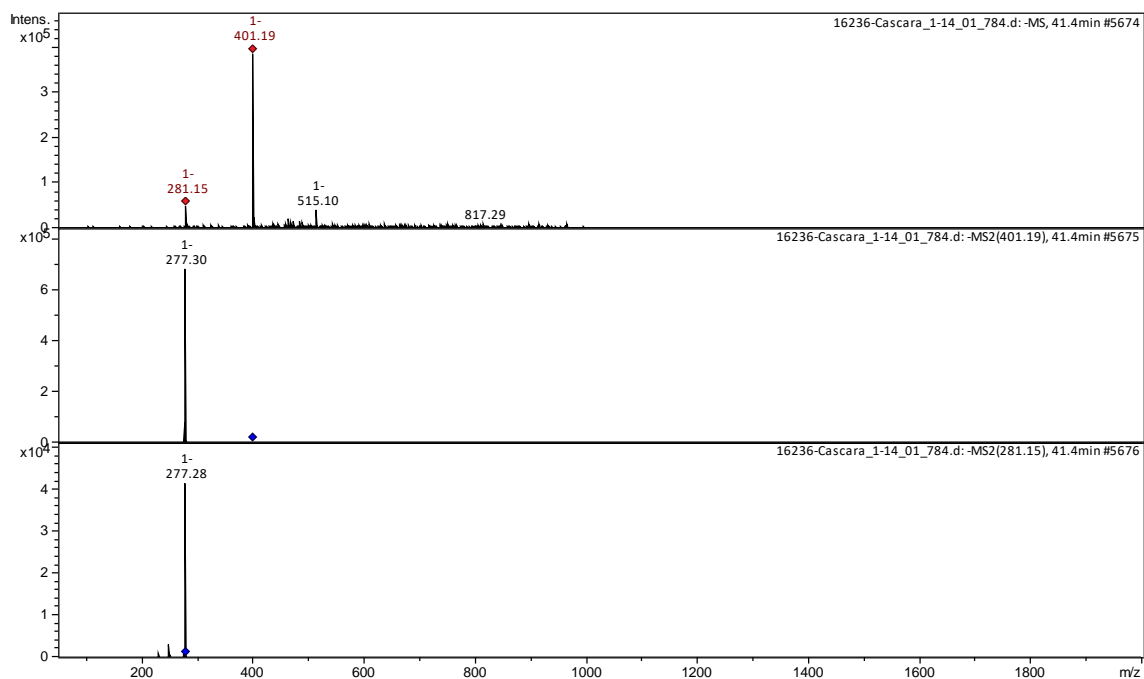


Figura 222: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 41,4 minutos.

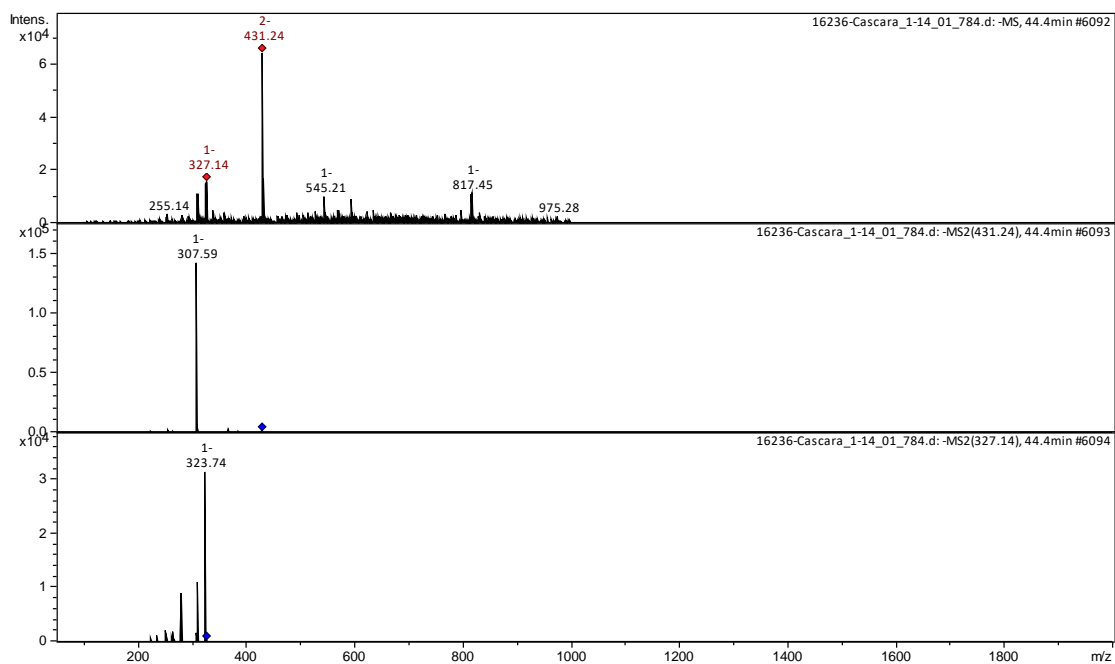


Figura 223: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 44,4 minutos.

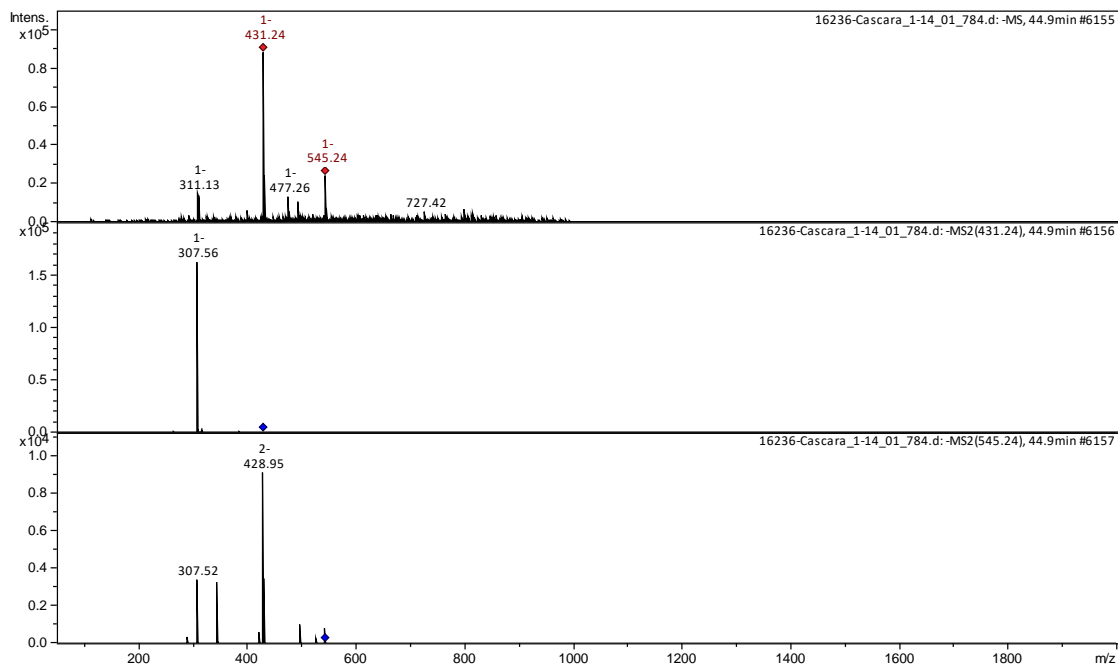


Figura 224: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 44,90 minutos.

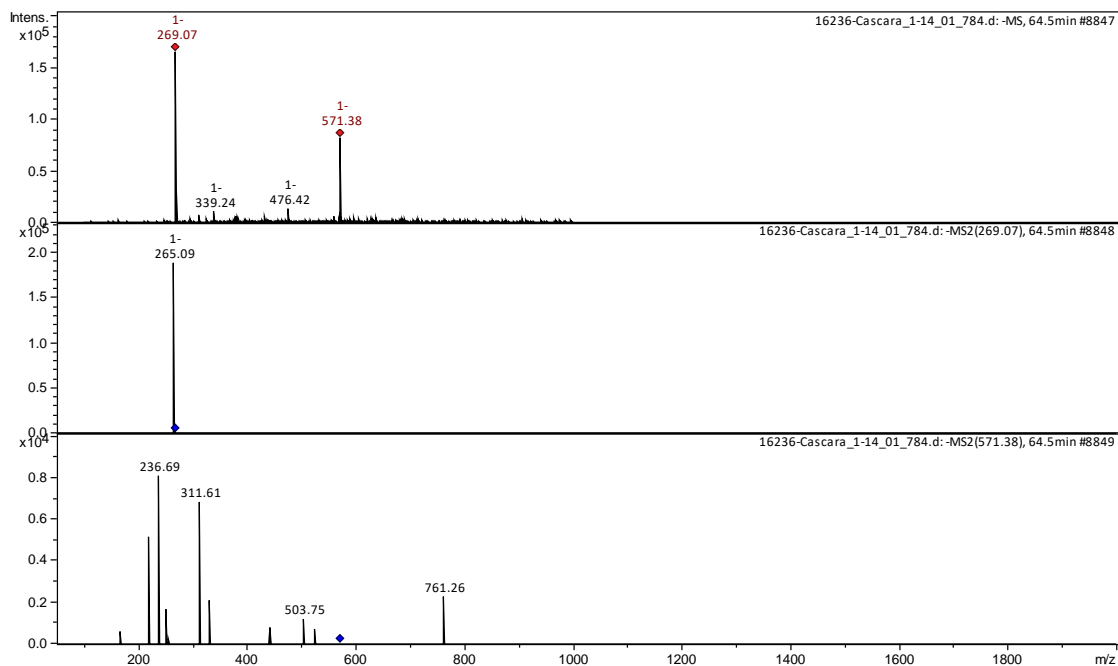


Figura 225: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 64,5 minutos.

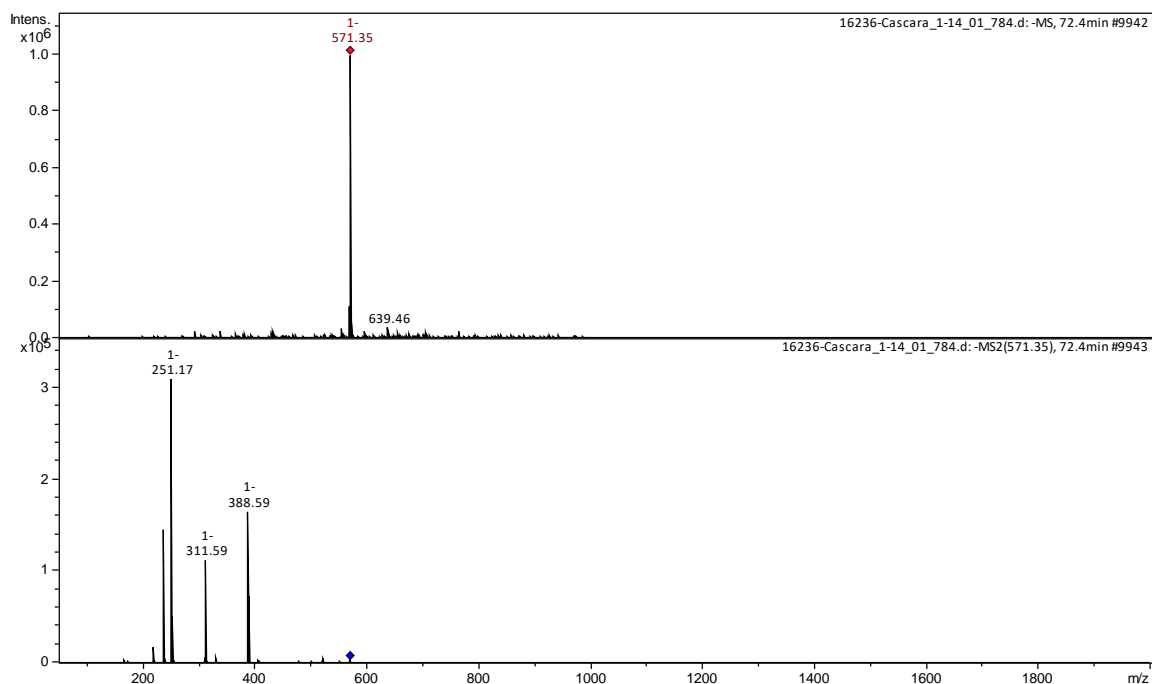


Figura 226: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 72,4 minutos.

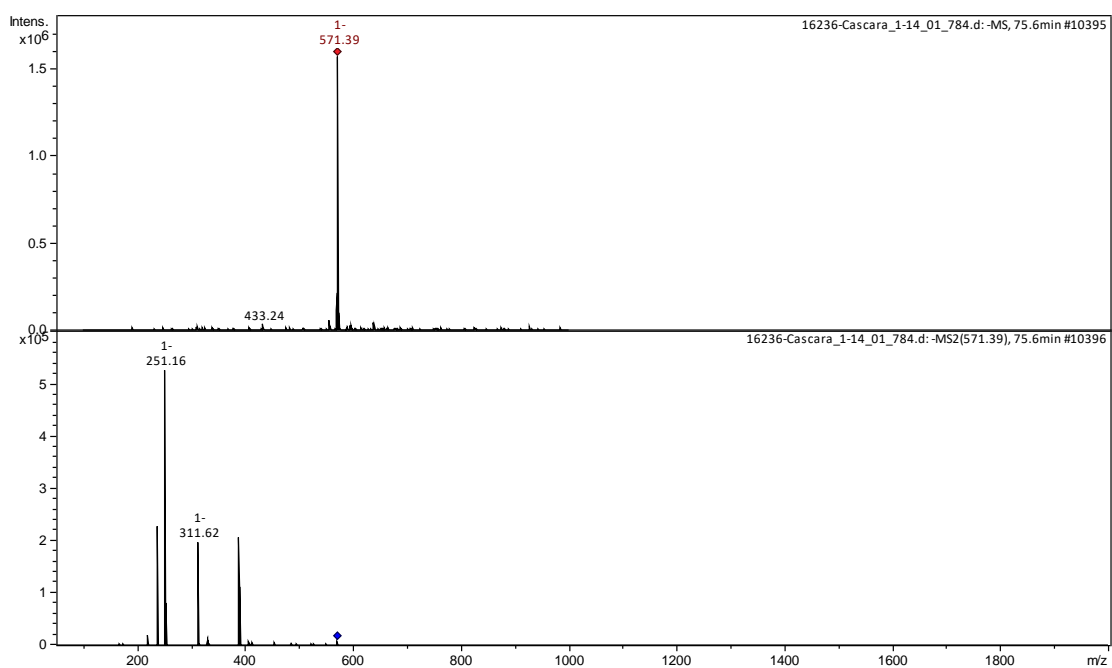


Figura 227: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 75,6 minutos.

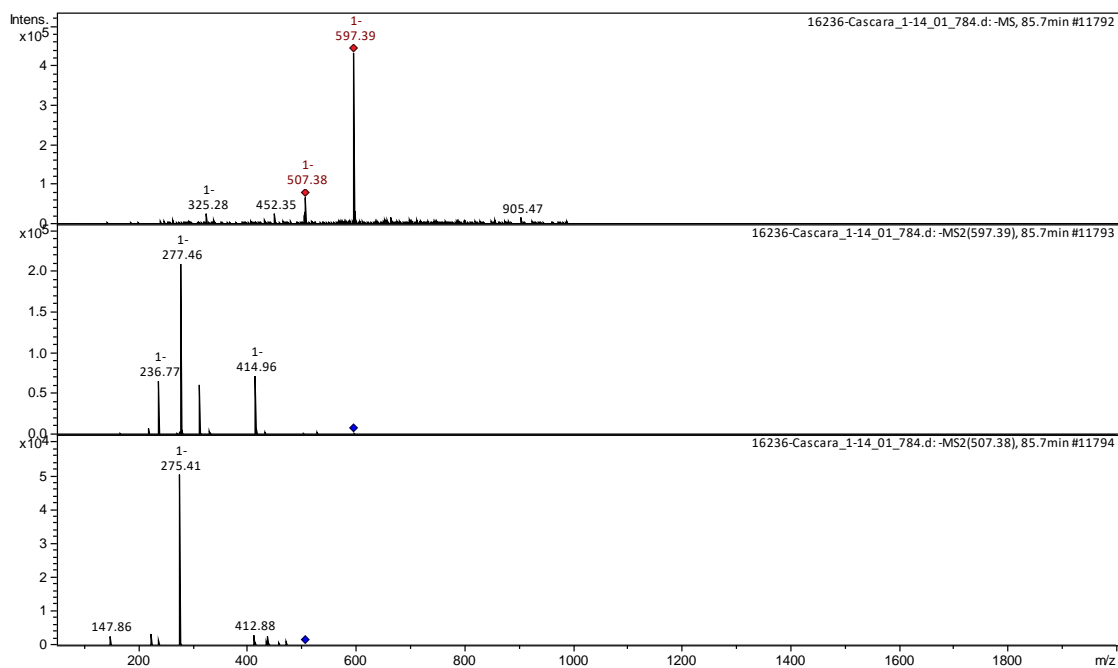


Figura 228: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 85,7 minutos.

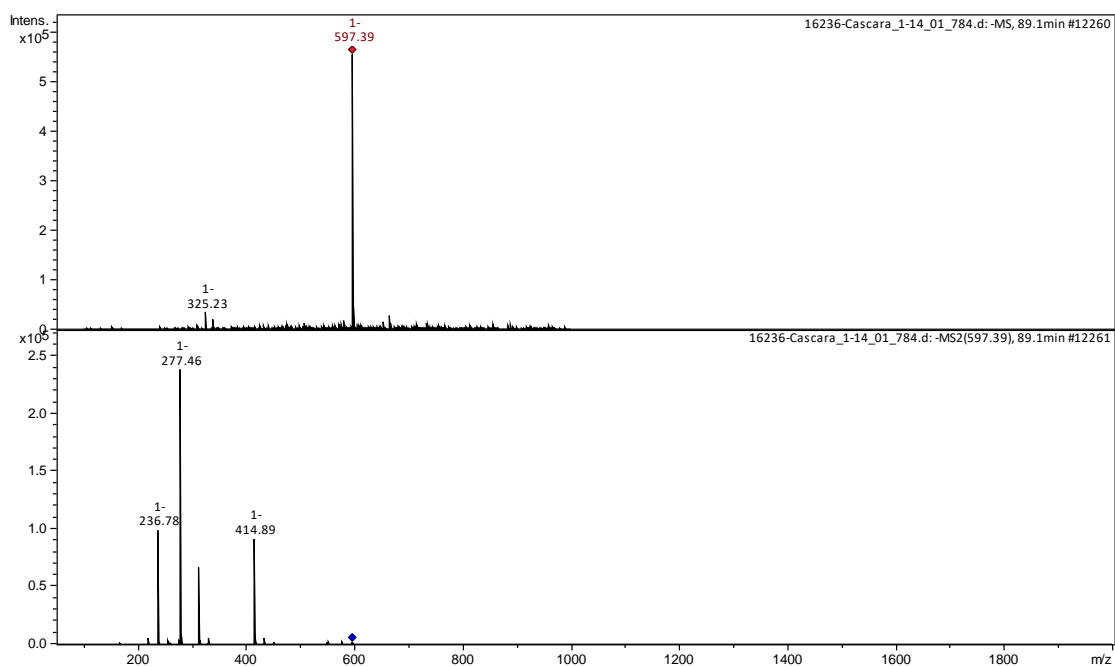


Figura 229: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 89,1 minutos.

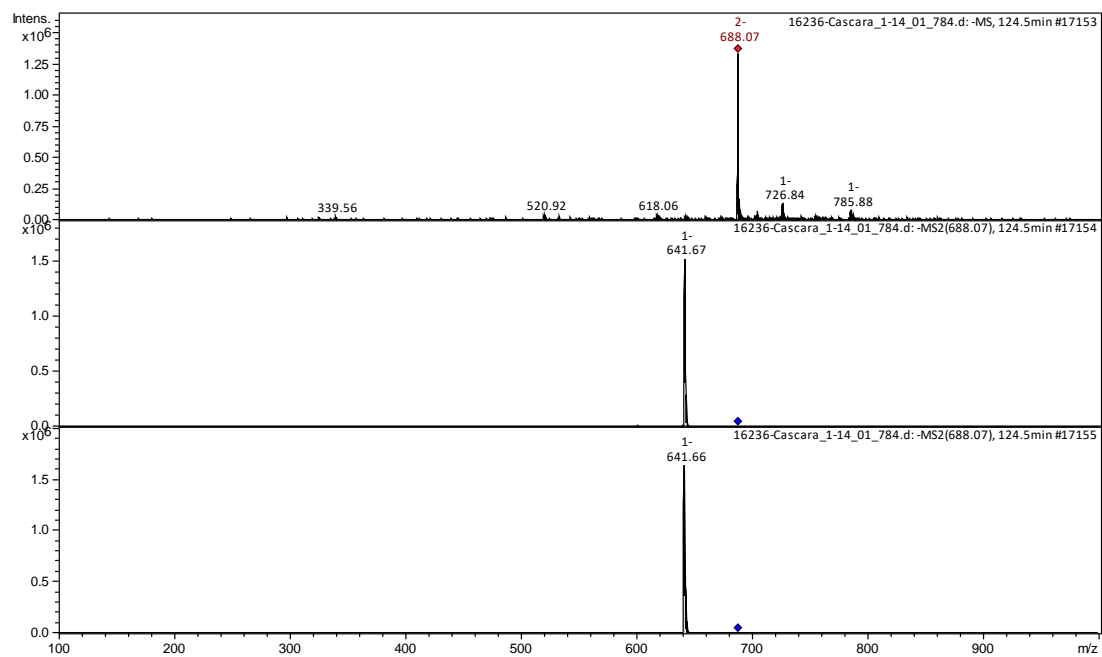


Figura 230: Espectro de massa de *Rhamnus purshiana* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 124,5 minutos.

12.3 Apêndice C

Espectros de massa de *Glycine max* obtido em **Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD**, Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C.

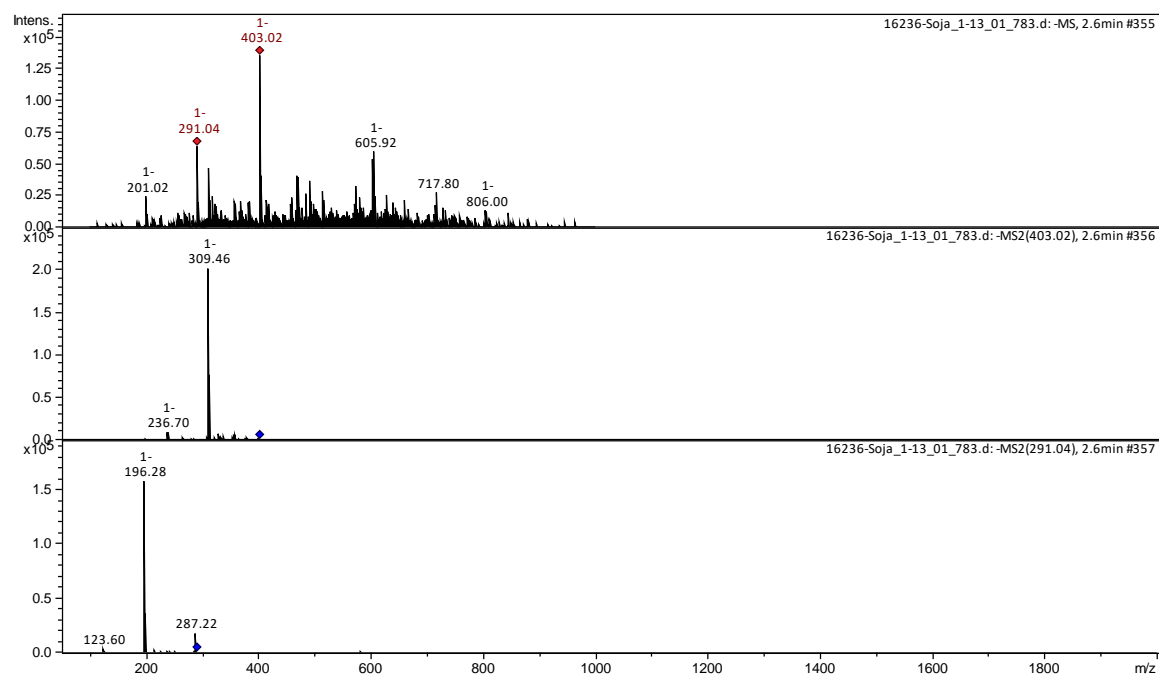


Figura 231: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 2,6 minutos.

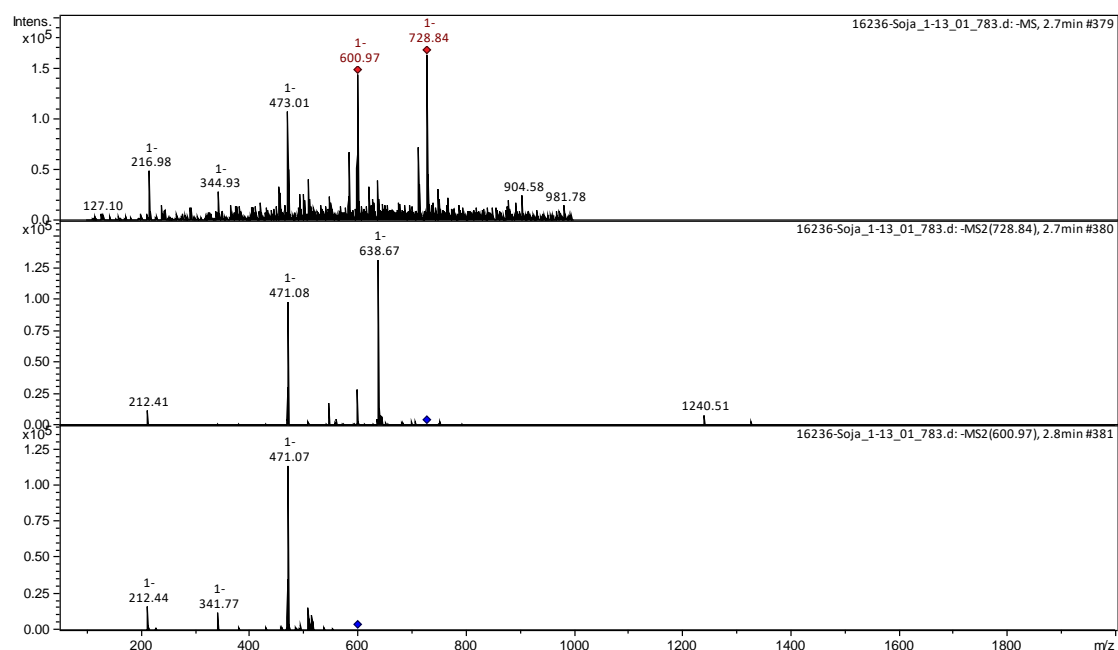


Figura 232: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 2,8 minutos.

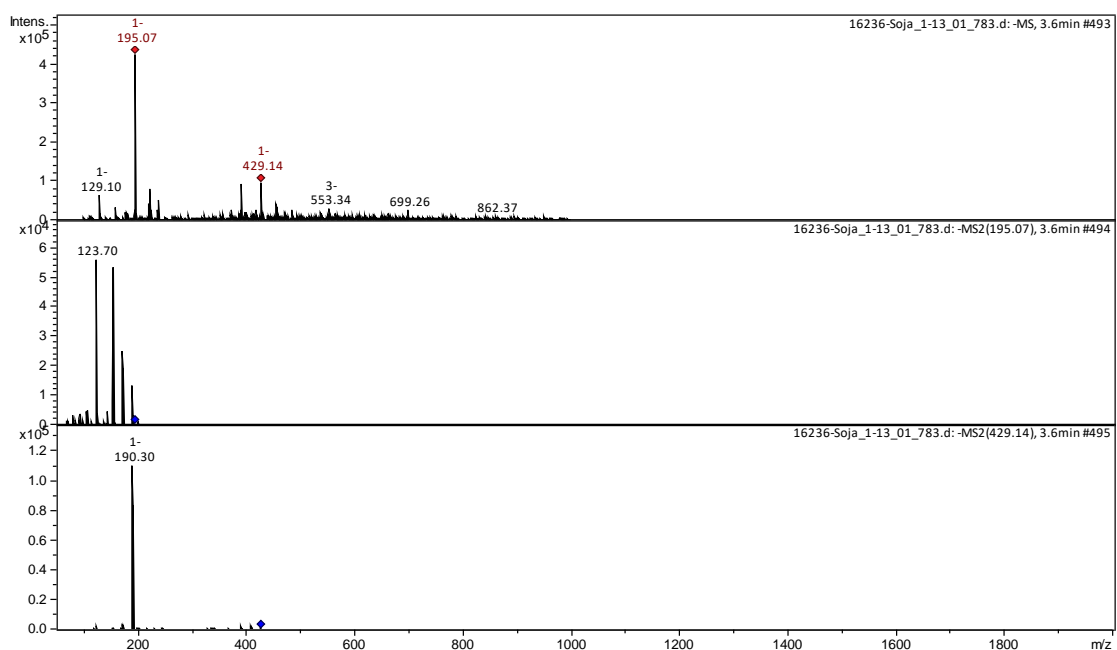


Figura 233: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 3,6 minutos.

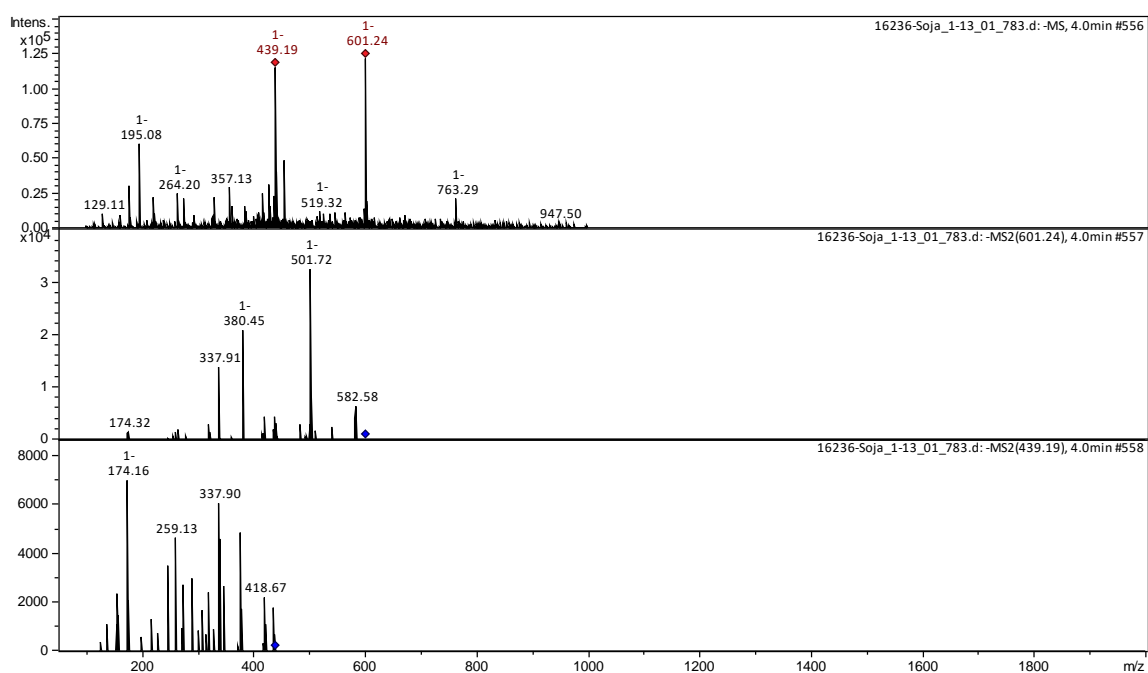


Figura 234: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,0 minutos.

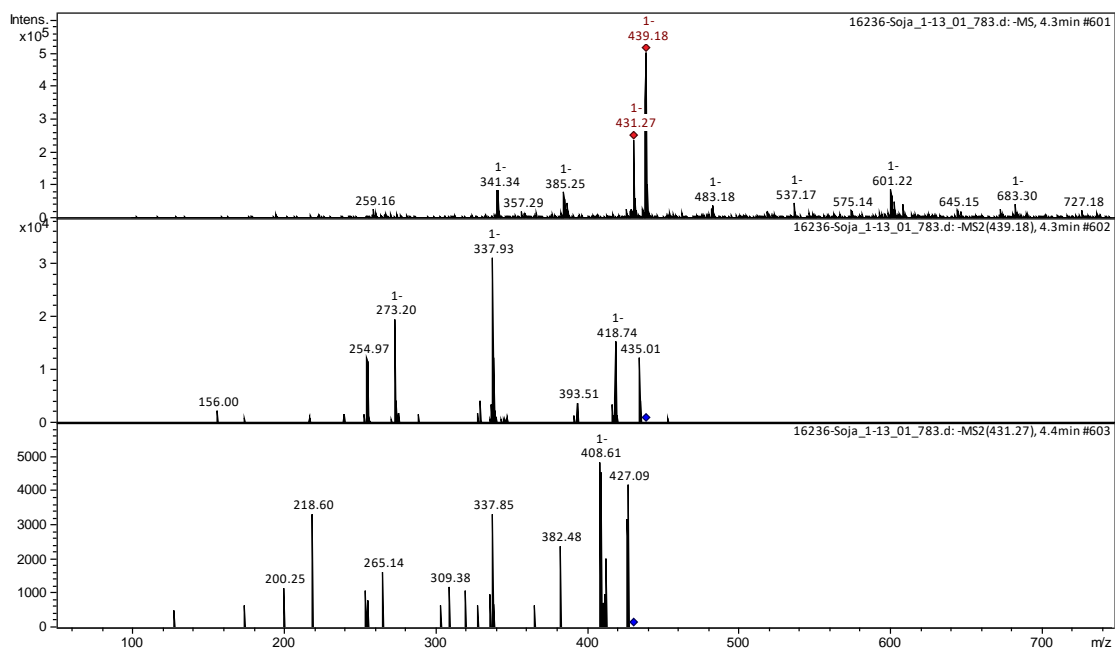


Figura 235: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,4 minutos.

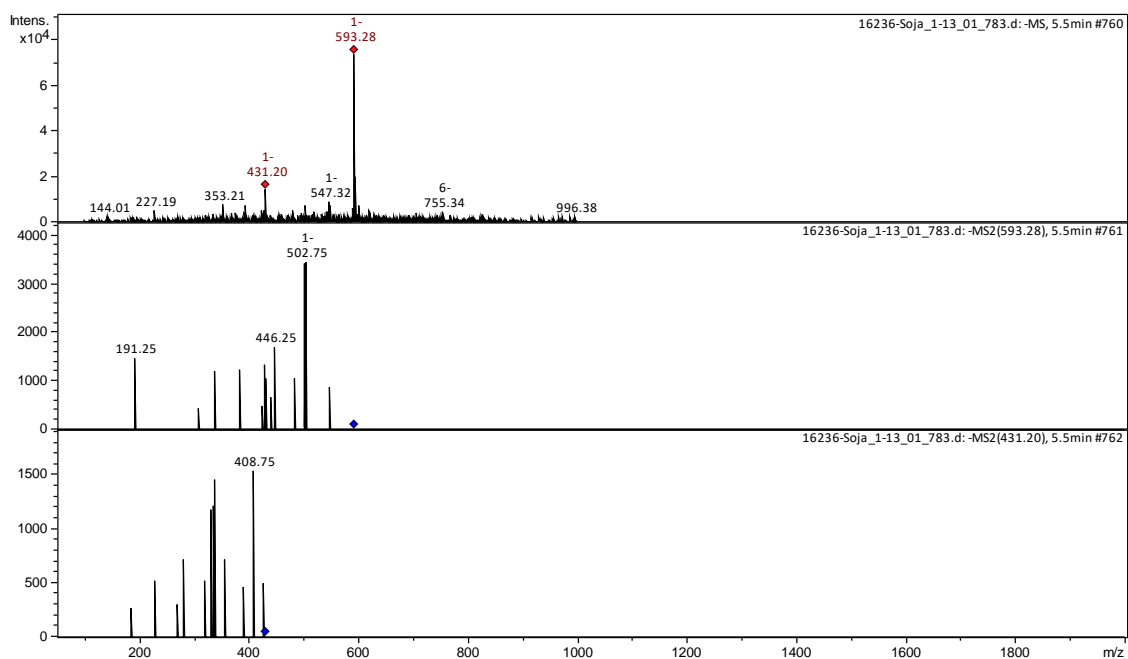


Figura 236: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 5,5 minutos.

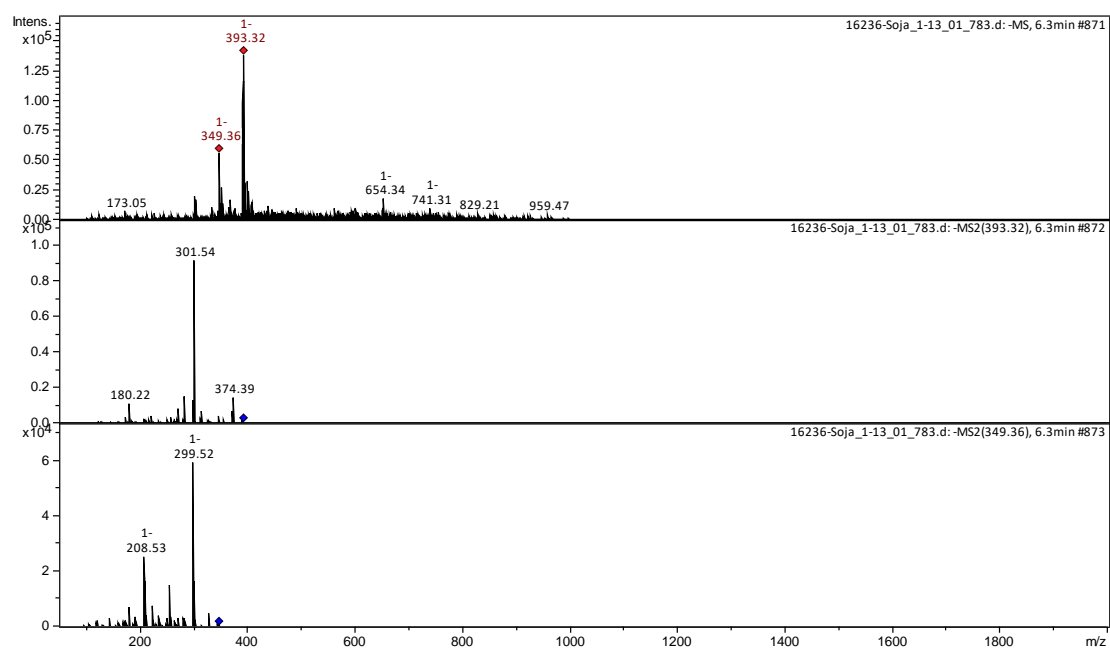


Figura 237: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 6,3 minutos.

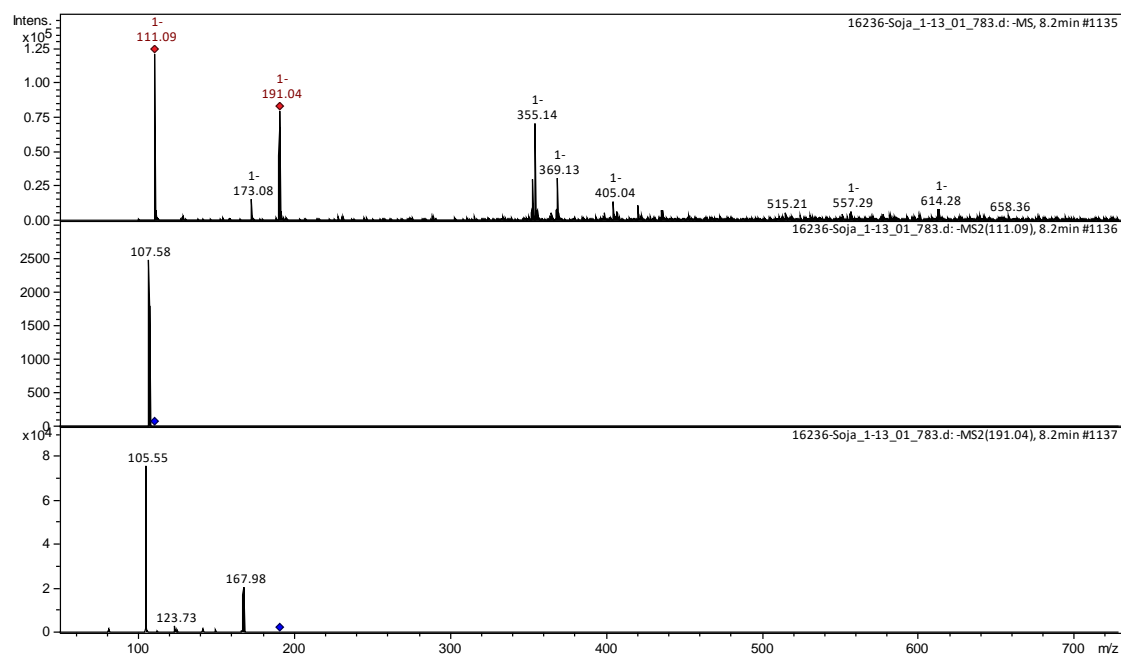


Figura 238: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 8,2 minutos.

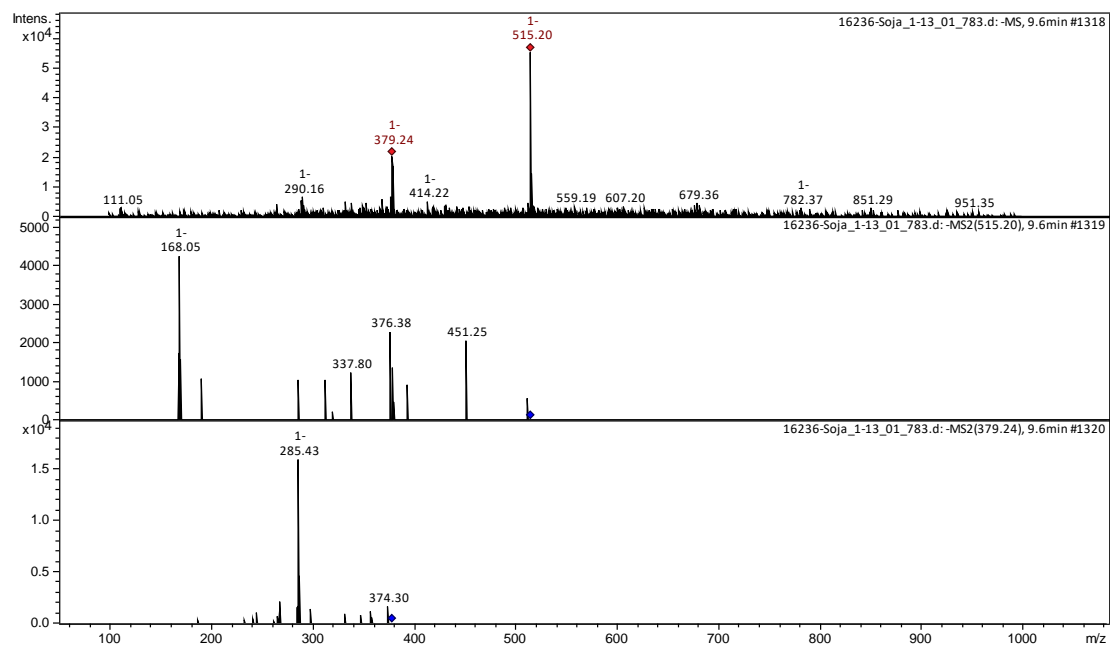


Figura 239: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 9,6 minutos.

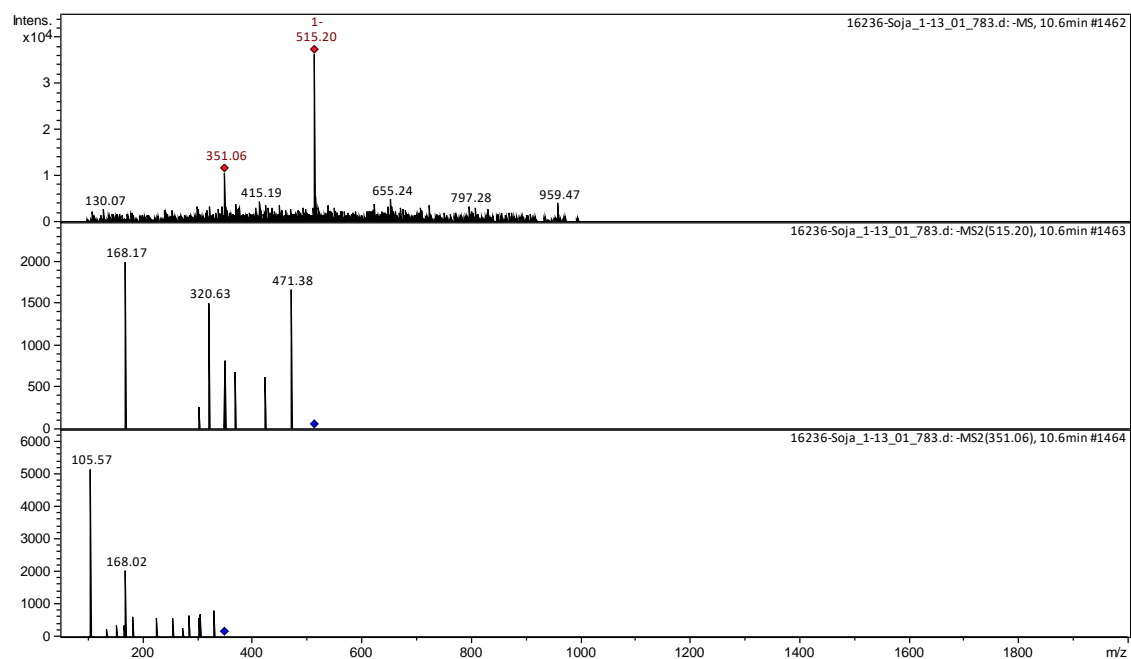


Figura 240: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 10,6 minutos.

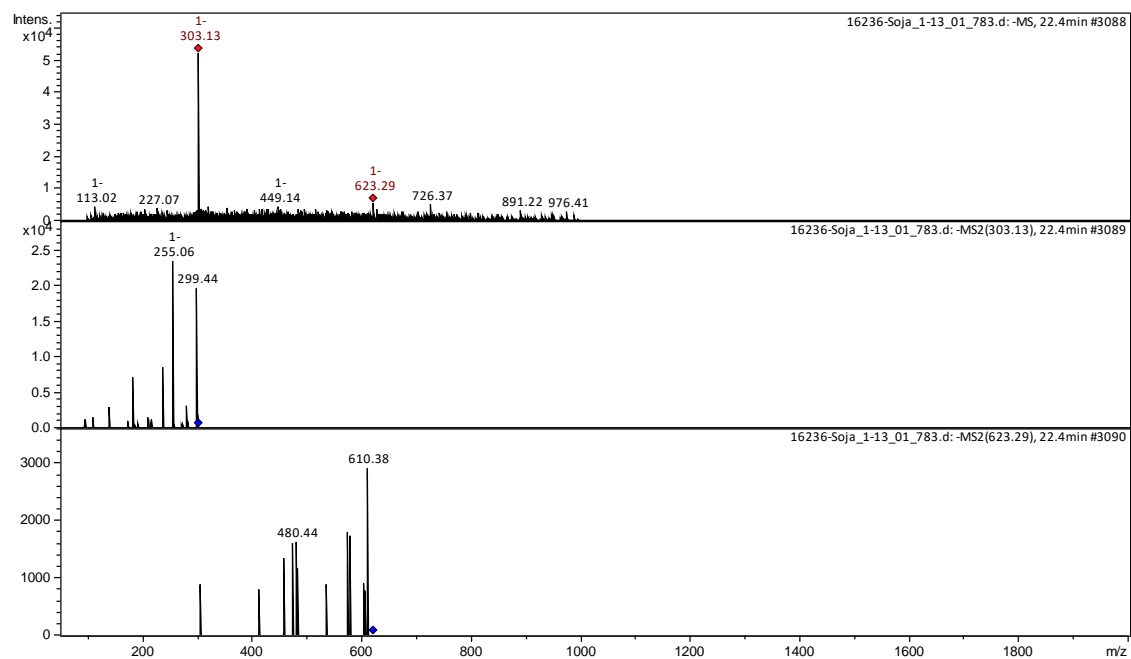


Figura 241: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 22,4 minutos.

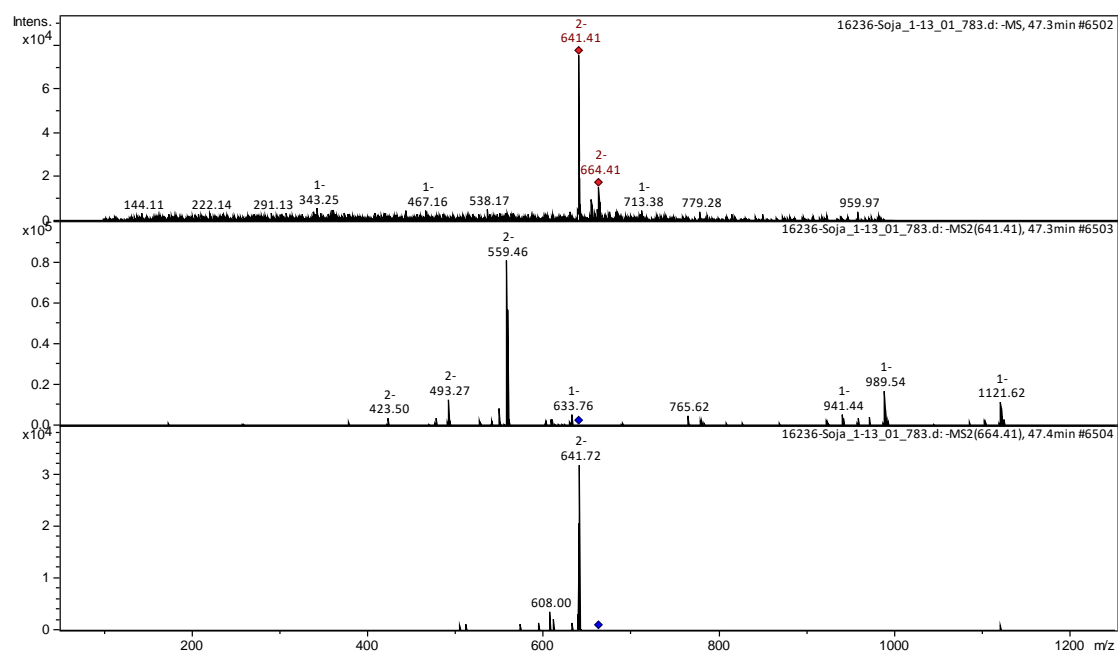


Figura 242: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 47,4 minutos.

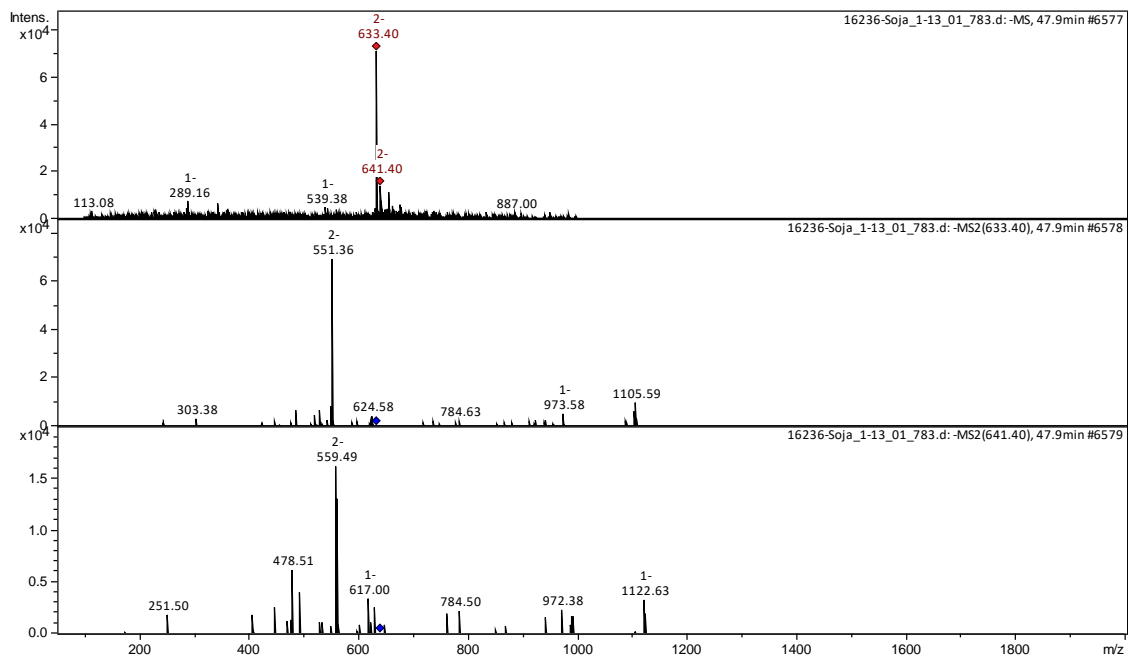


Figura 243: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 47,9 minutos.

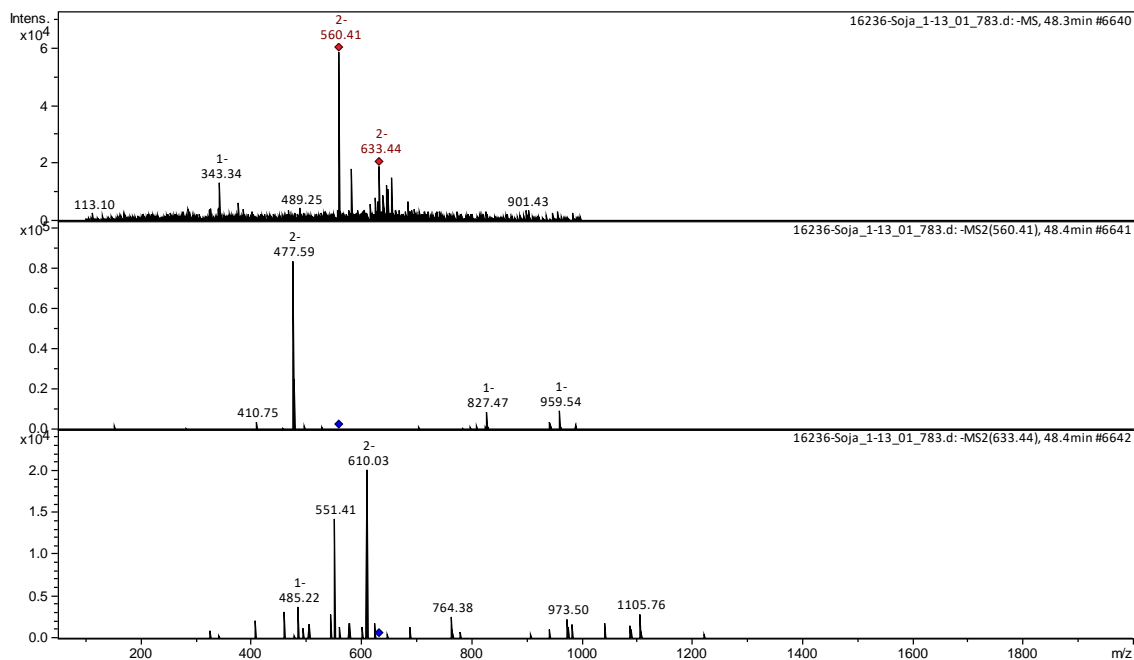


Figura 244: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 48,4 minutos.

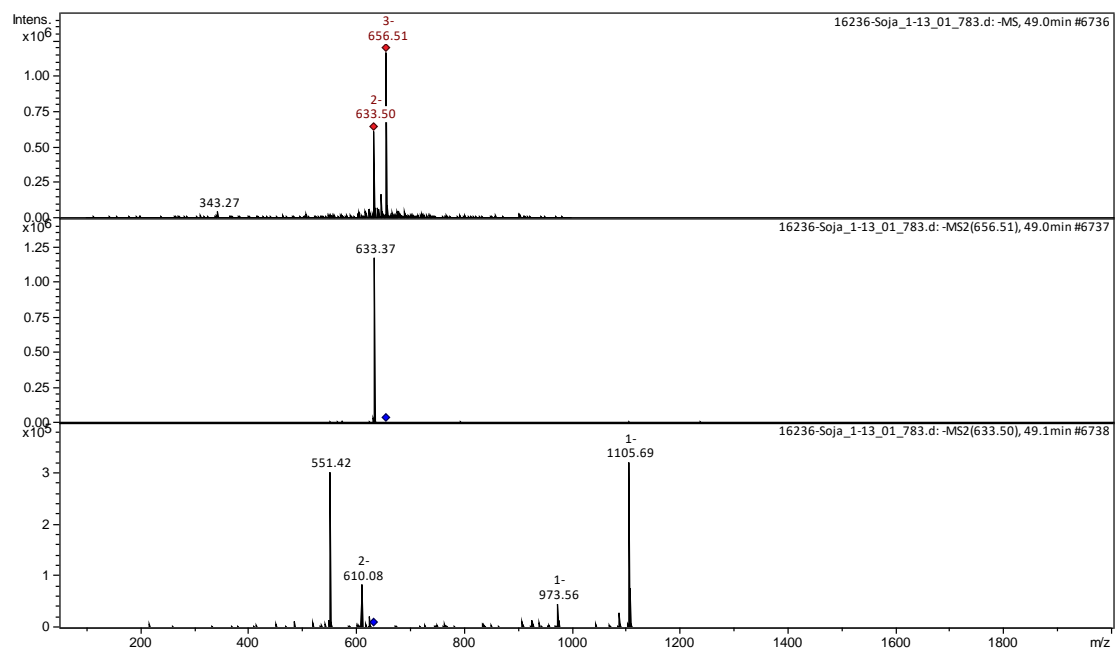


Figura 245: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 49,1 minutos.

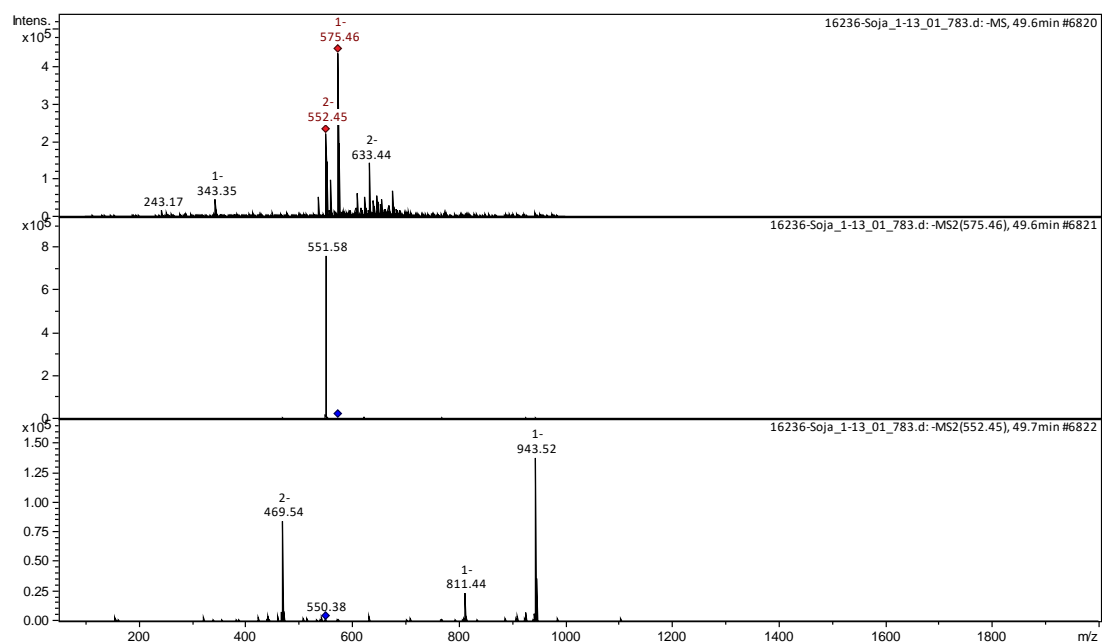


Figura 246: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 49,7 minutos.

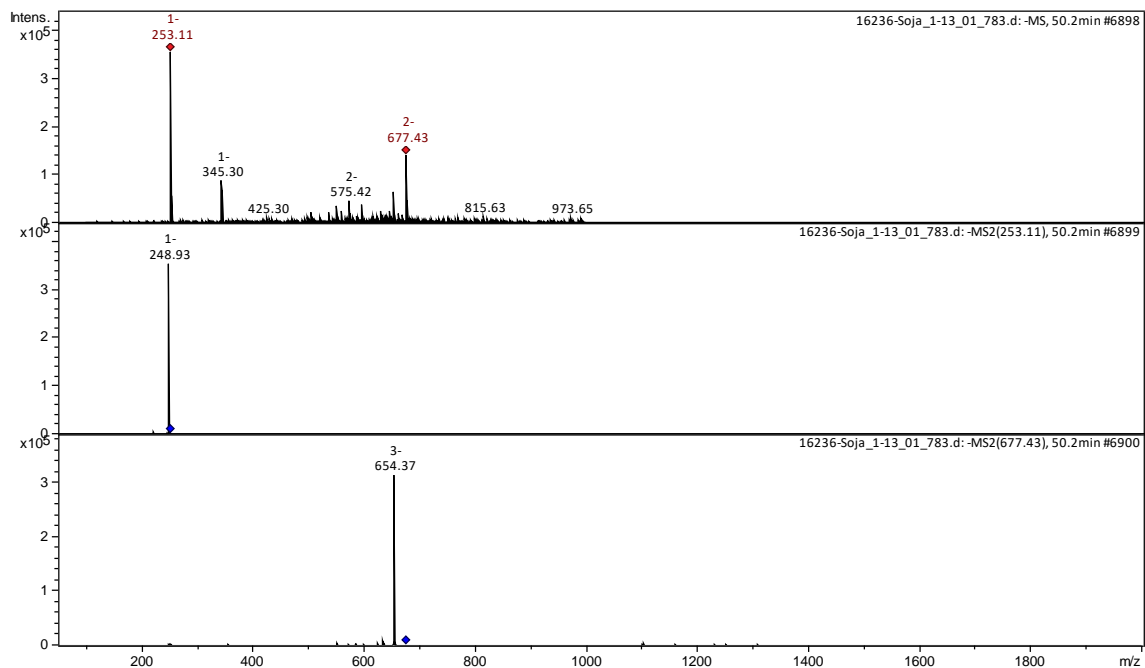


Figura 247: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 50,2 minutos.

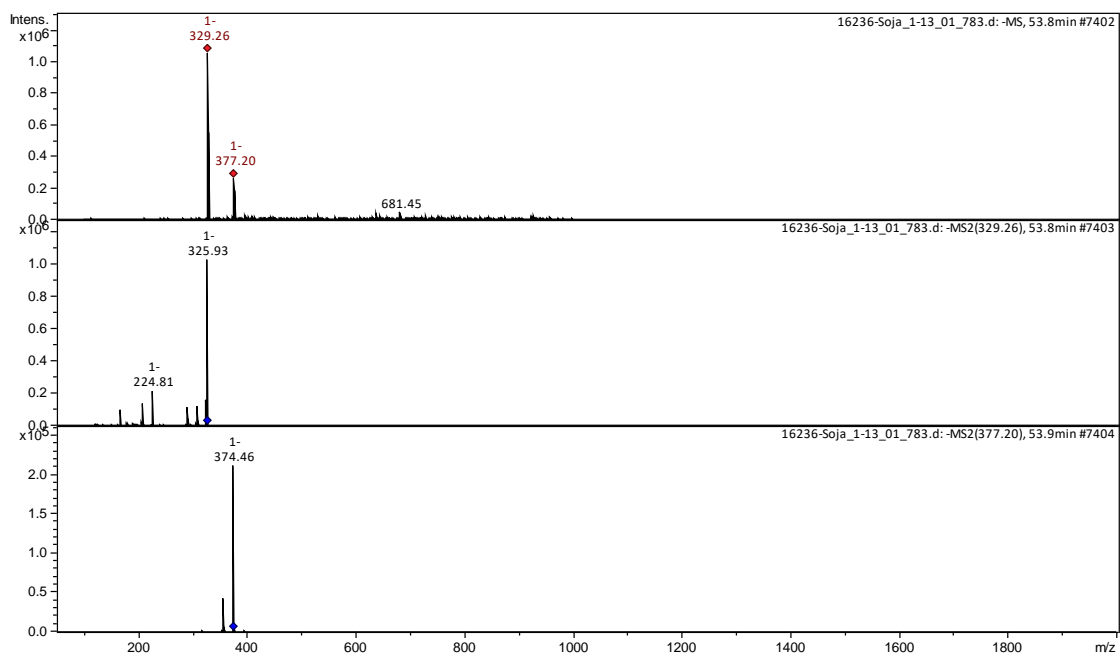


Figura 248: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 53,9 minutos.

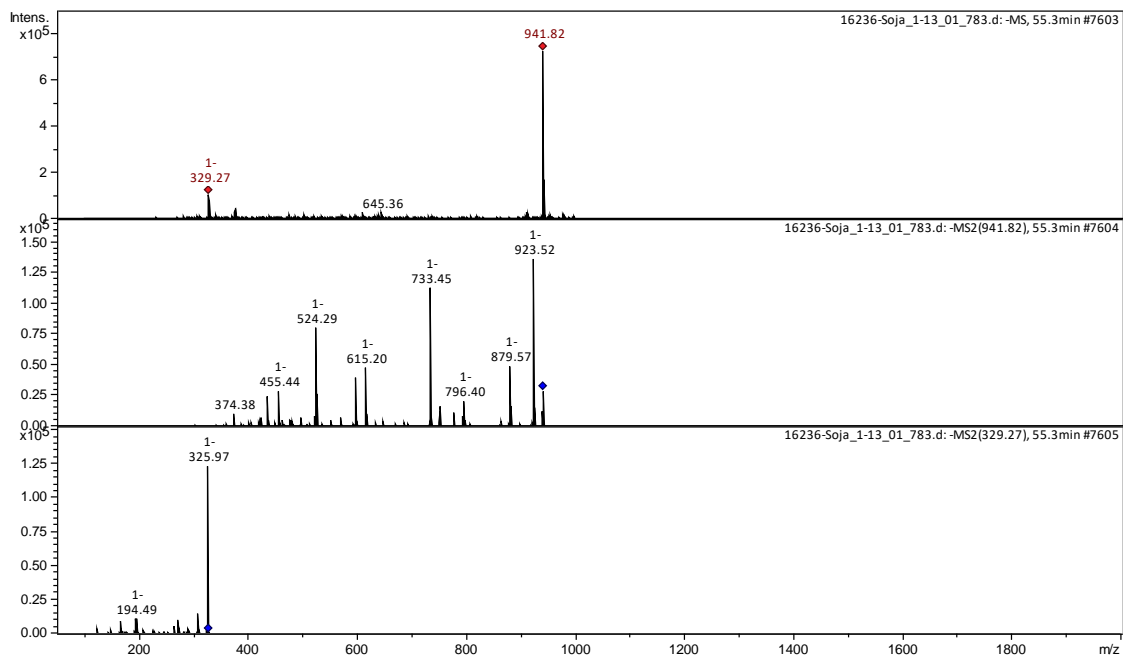


Figura 249: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 55,3 minutos.

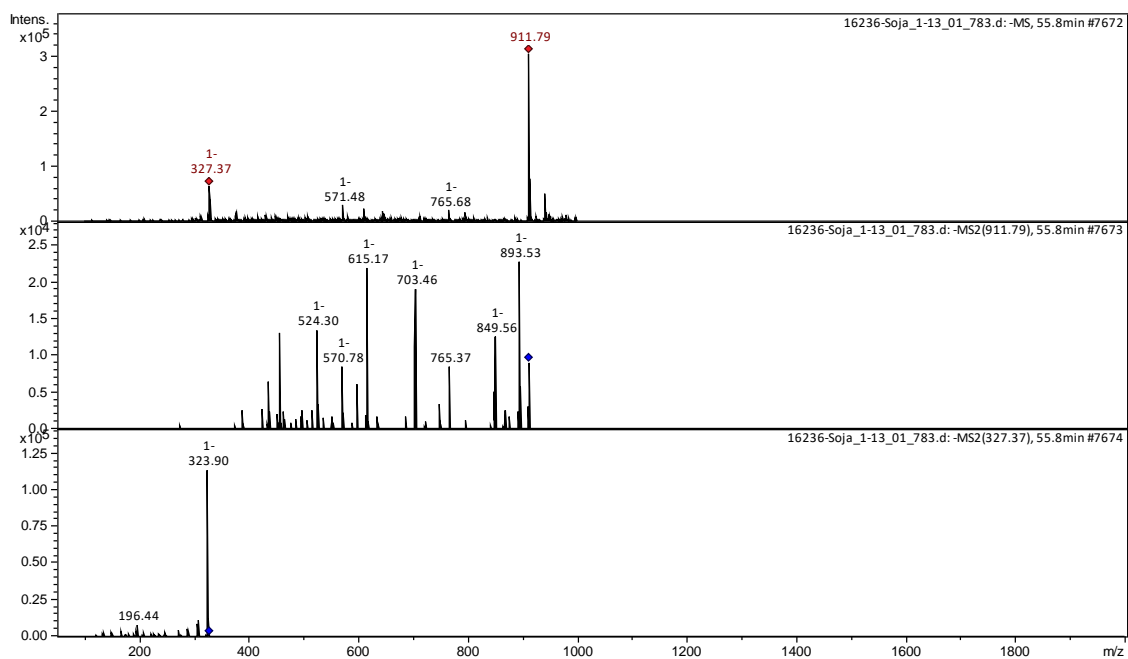


Figura 250: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 55,8 minutos.

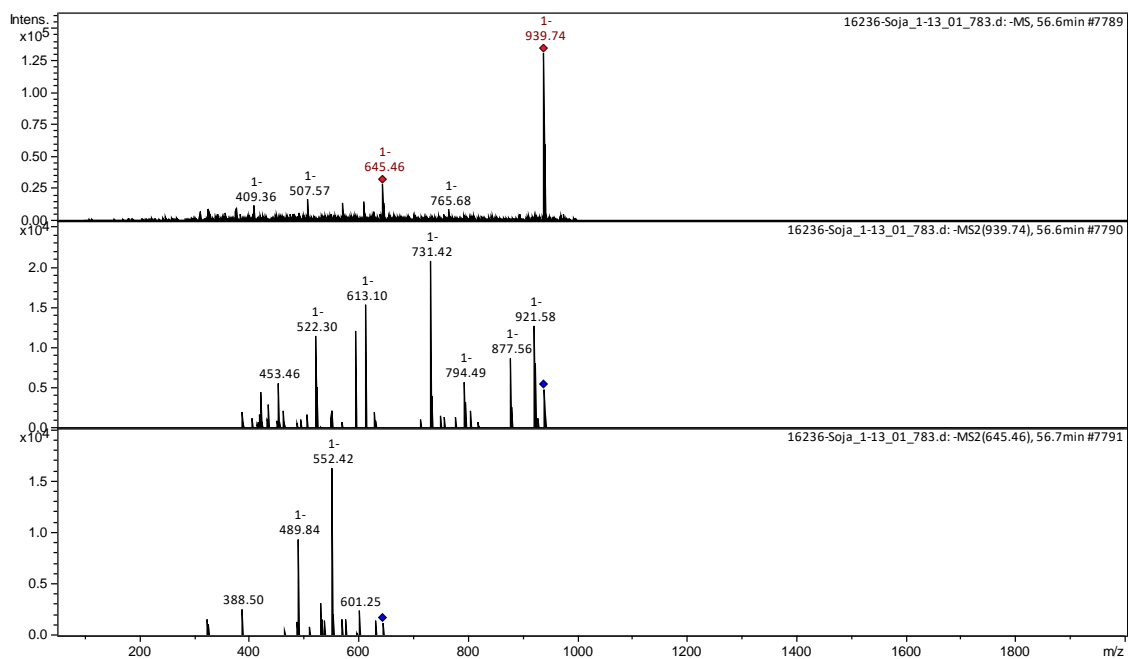


Figura 251: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 56,7 minutos.

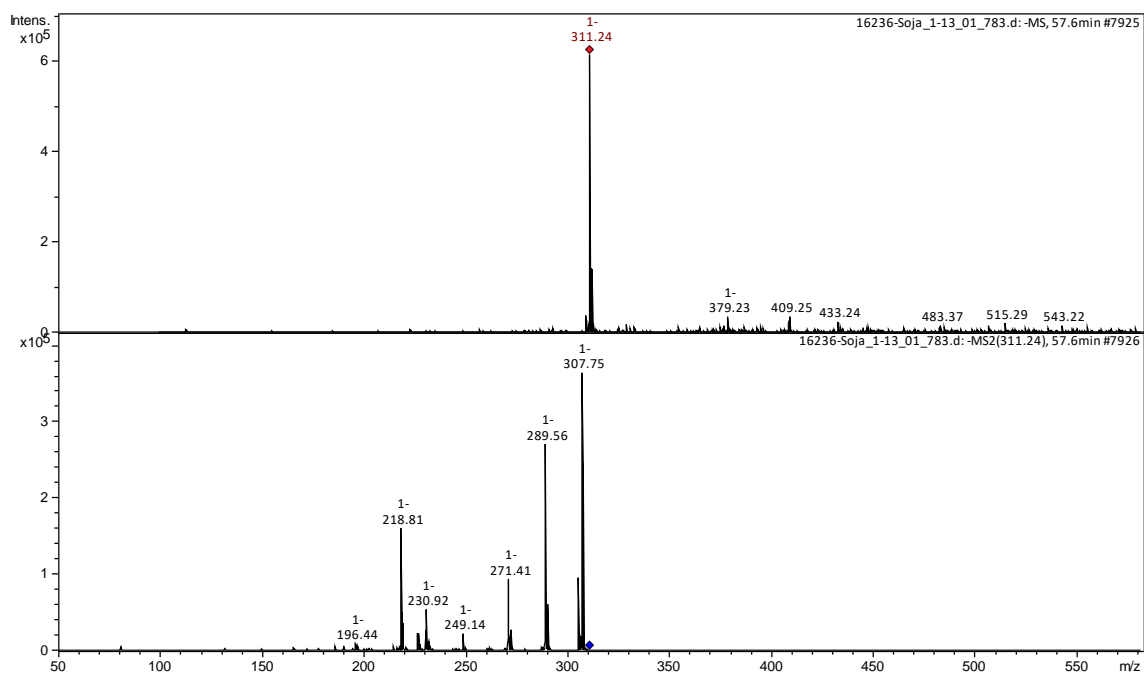


Figura 252: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 57,6 minutos.

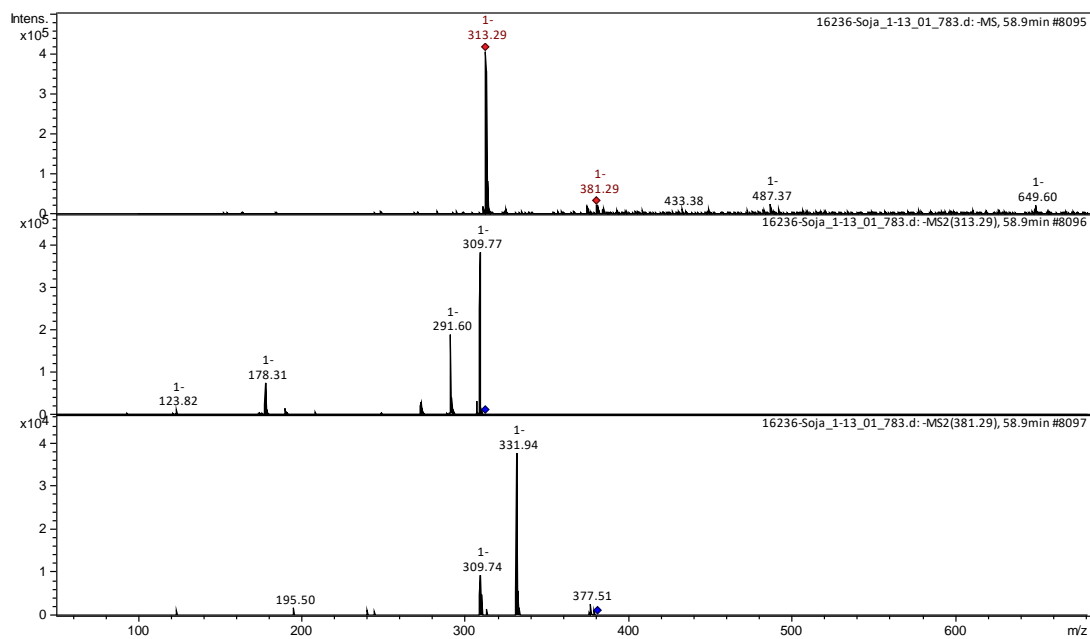


Figura 253: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 58,9 minutos.

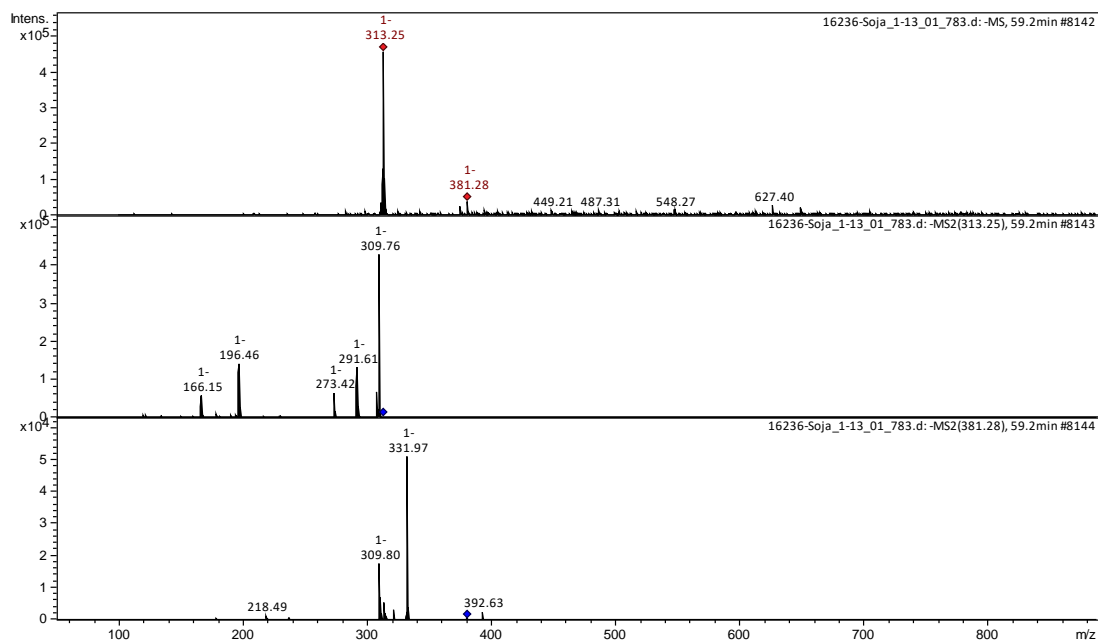


Figura 254: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 59,2 minutos.

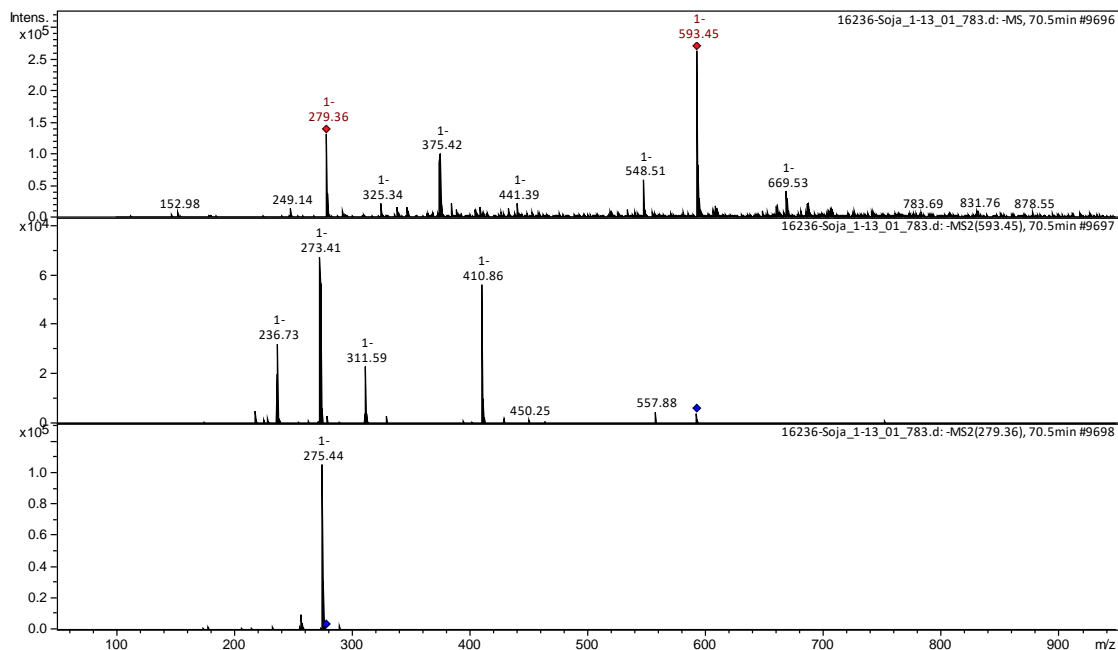


Figura 255: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 70,5 minutos.

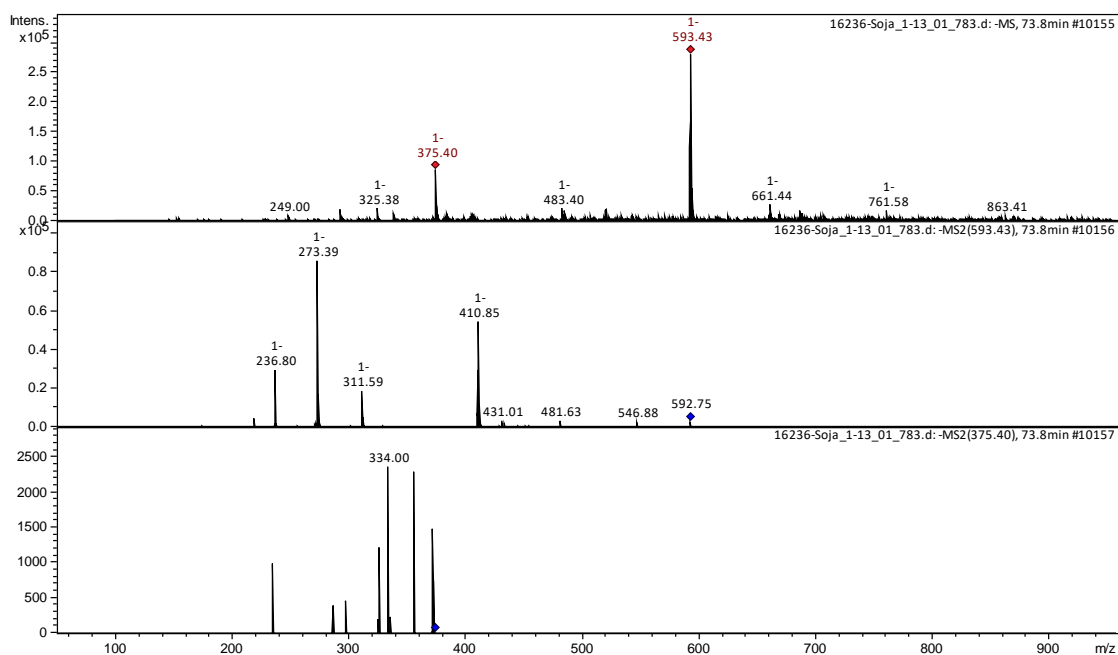


Figura 256: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 73,8 minutos.

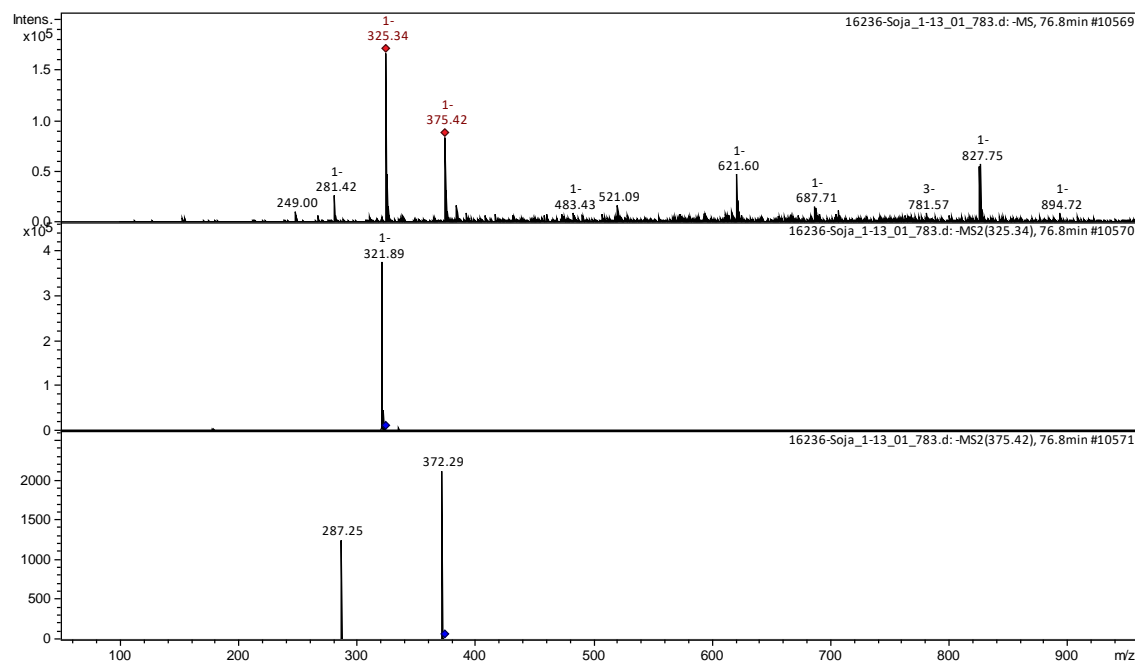


Figura 257: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 76,8 minutos.

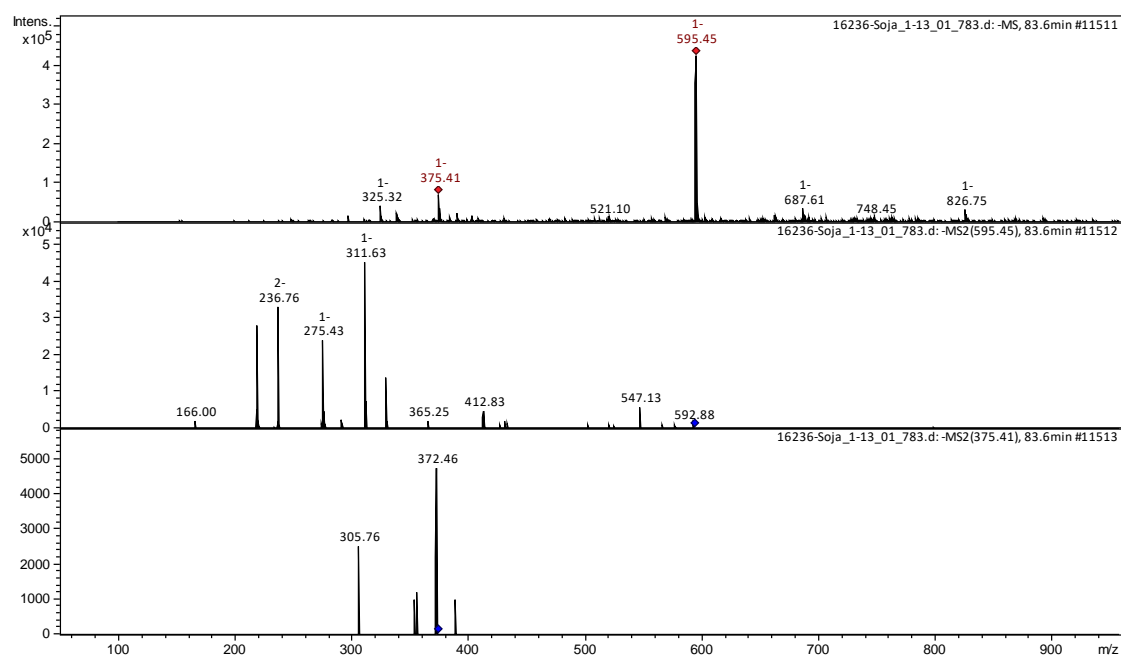


Figura 258: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 83,6 minutos.

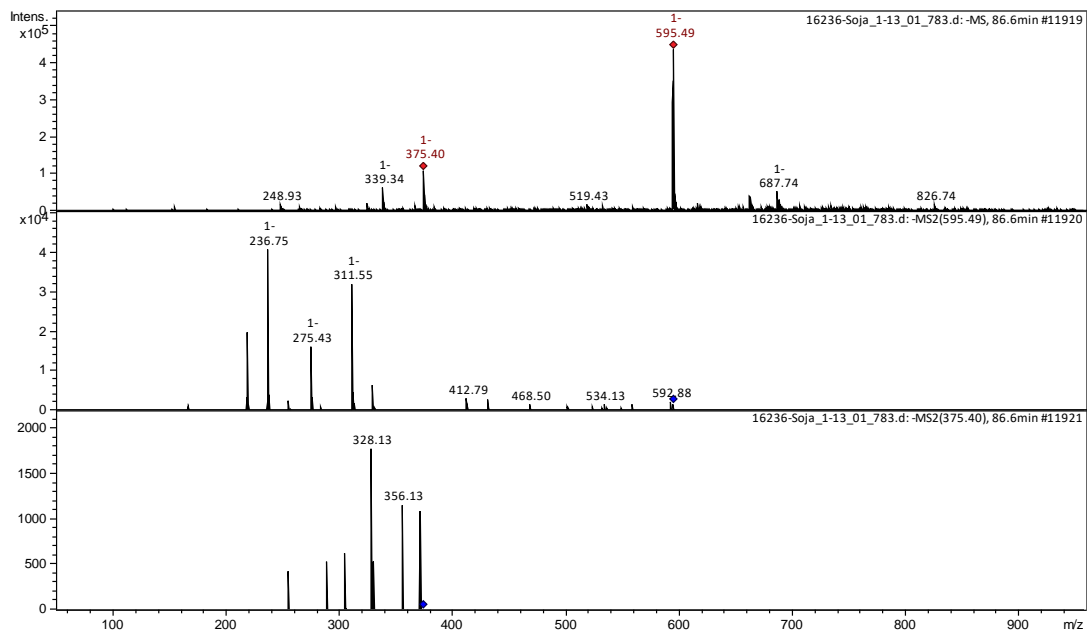


Figura 259: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 86,6 minutos.

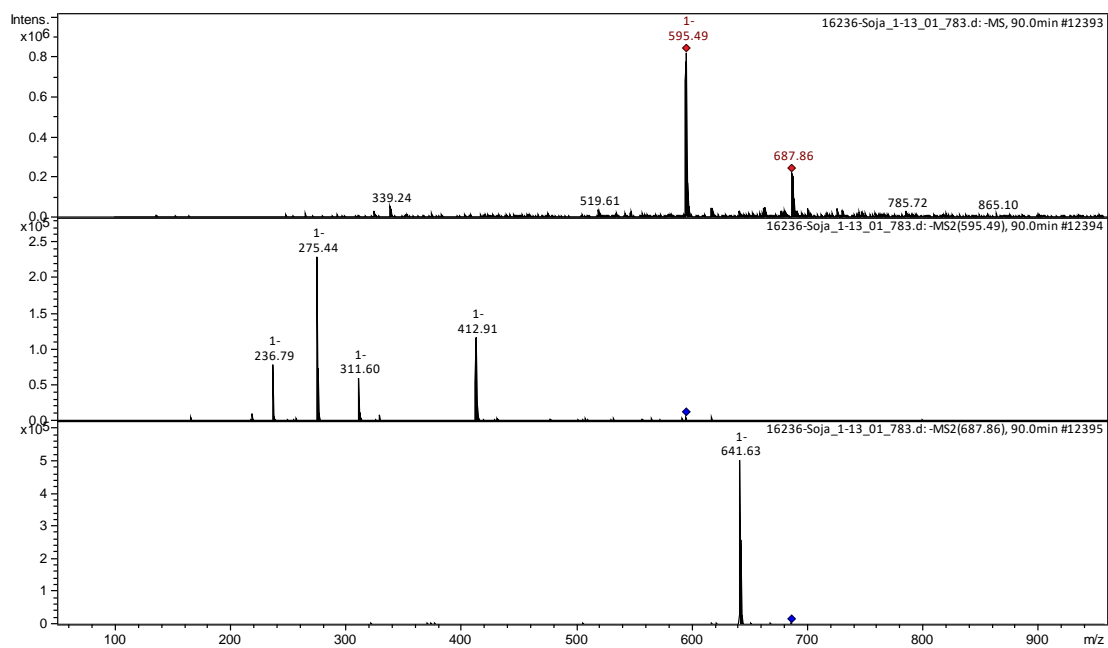


Figura 260: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 90,0 minutos.

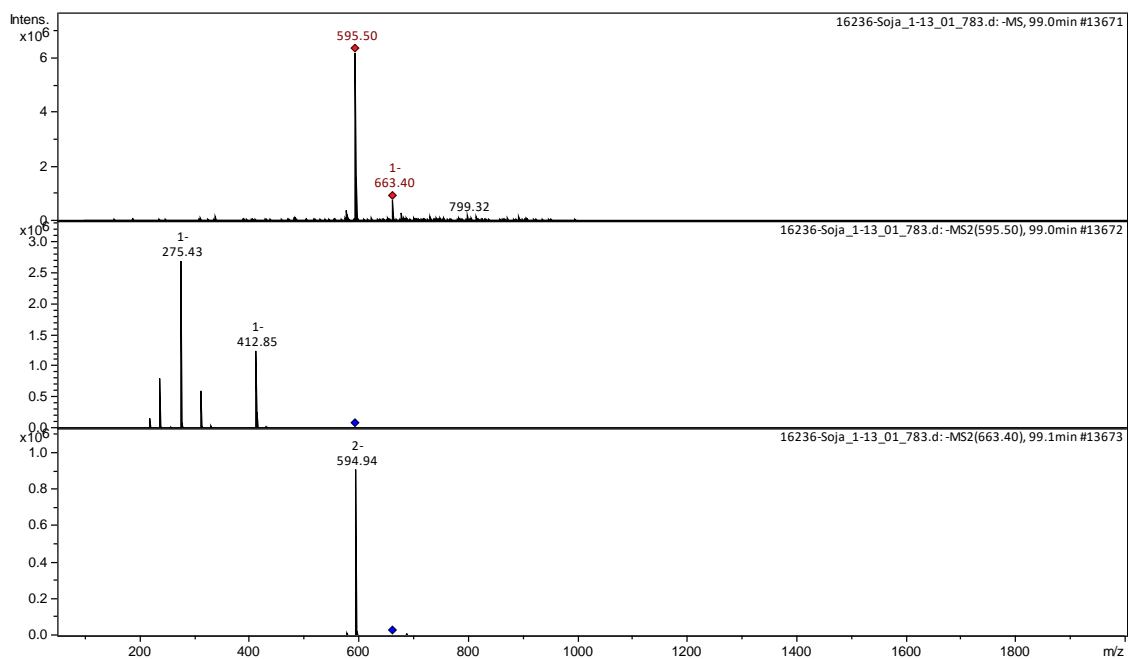


Figura 261: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 99,1 minutos.

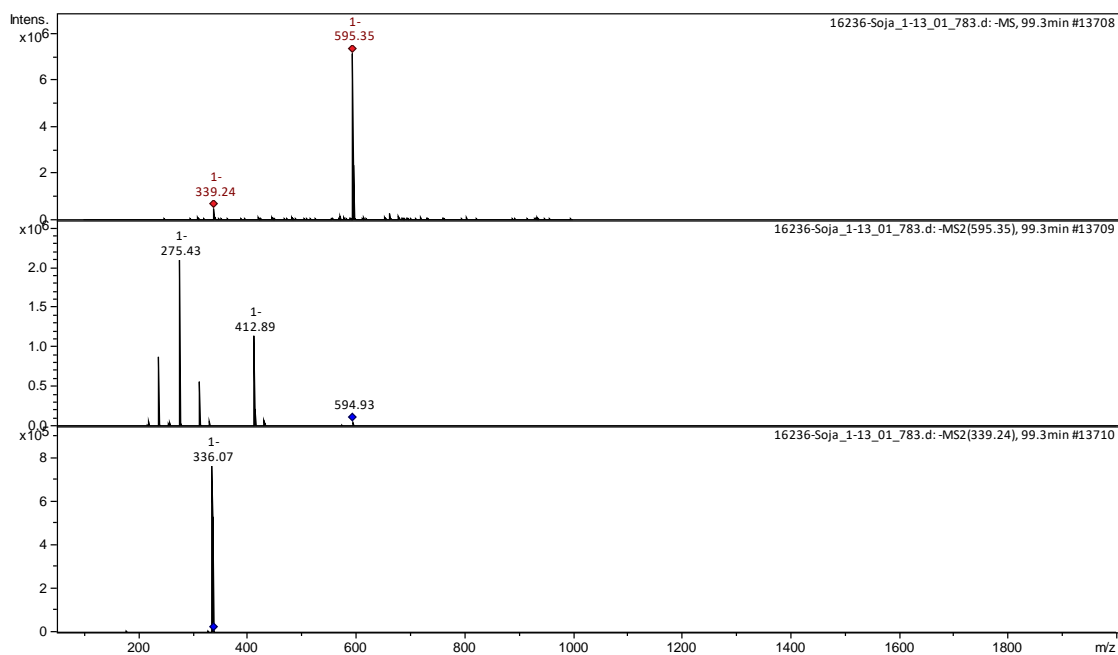


Figura 262: Espectro de massa de *Glycine max* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 99,3 minutos.

12.4 Apêndice D

Espectros de massa de *Plantago ovata* obtido em **Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD**, Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C.

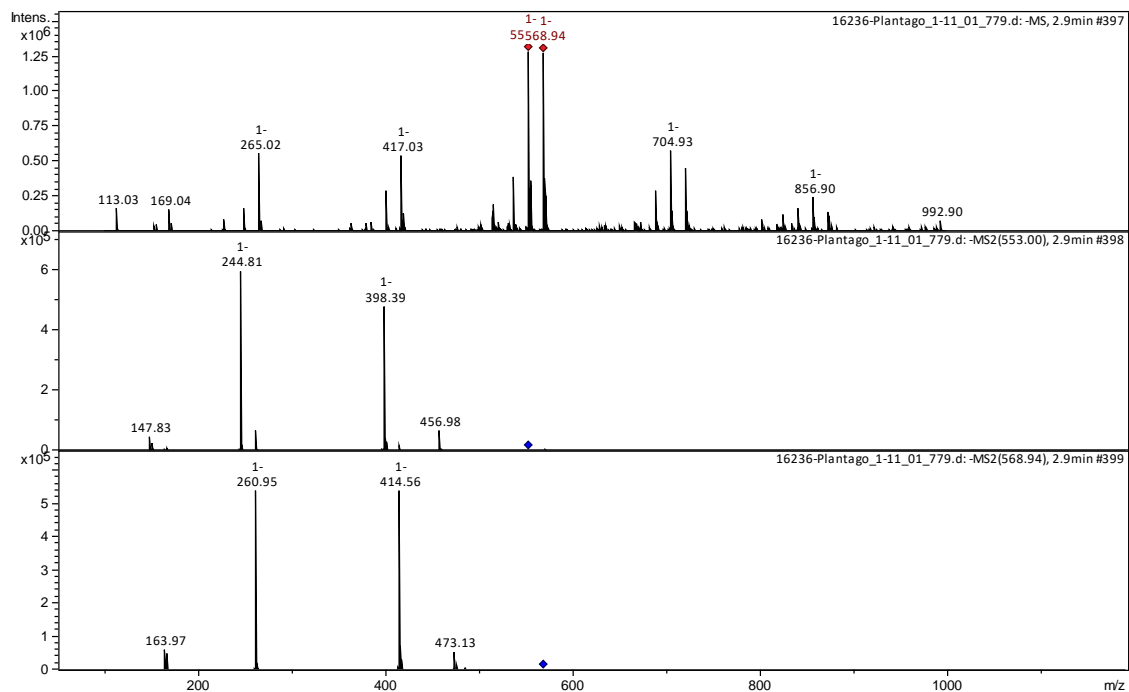


Figura 263: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 2,9 minutos.

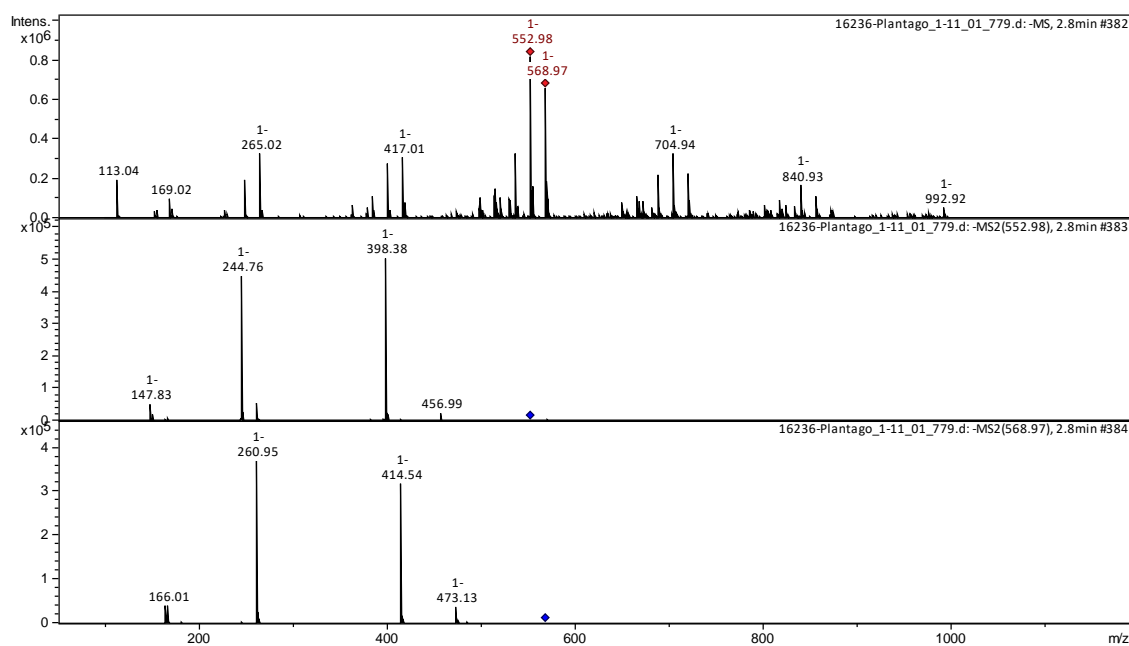


Figura 264: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 2,8 minutos.

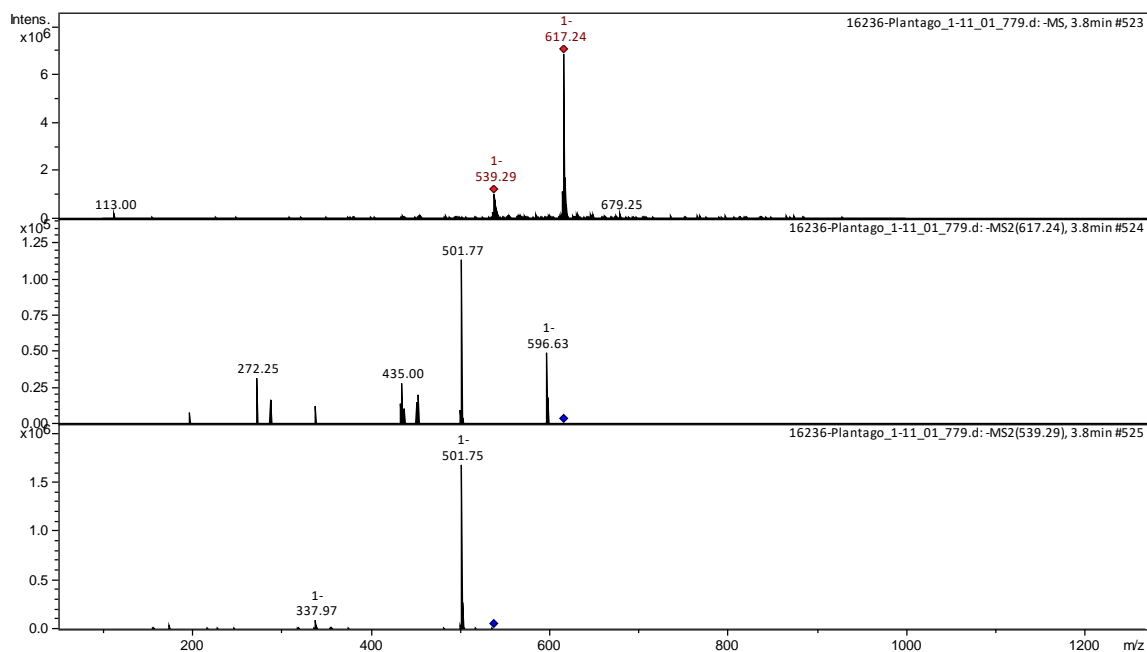


Figura 265: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 3,8 minutos.

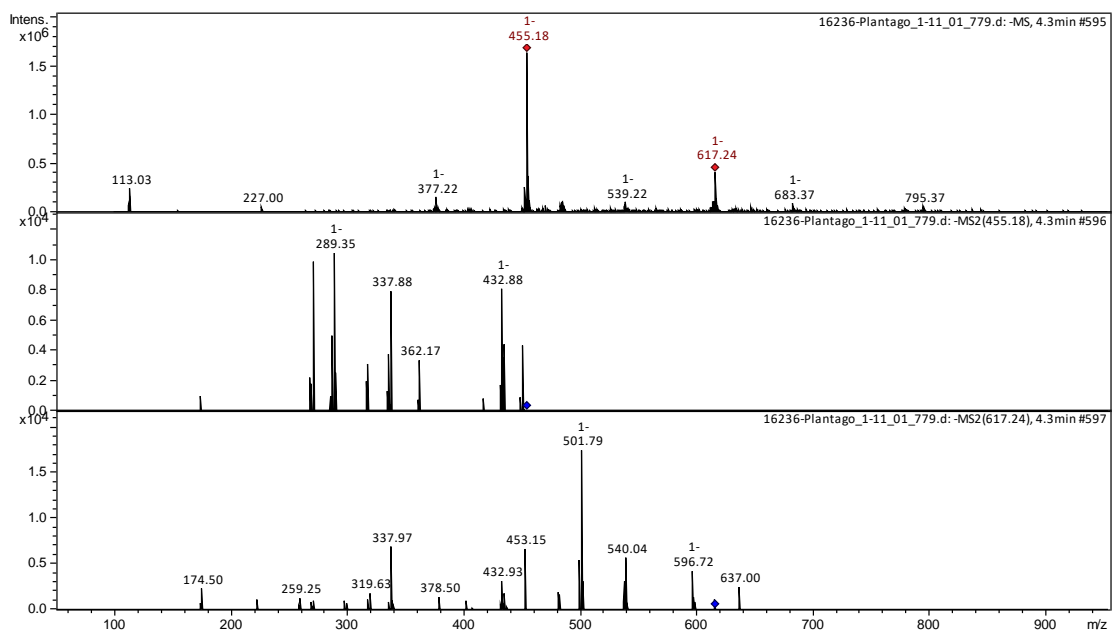


Figura 266: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,3 minutos.

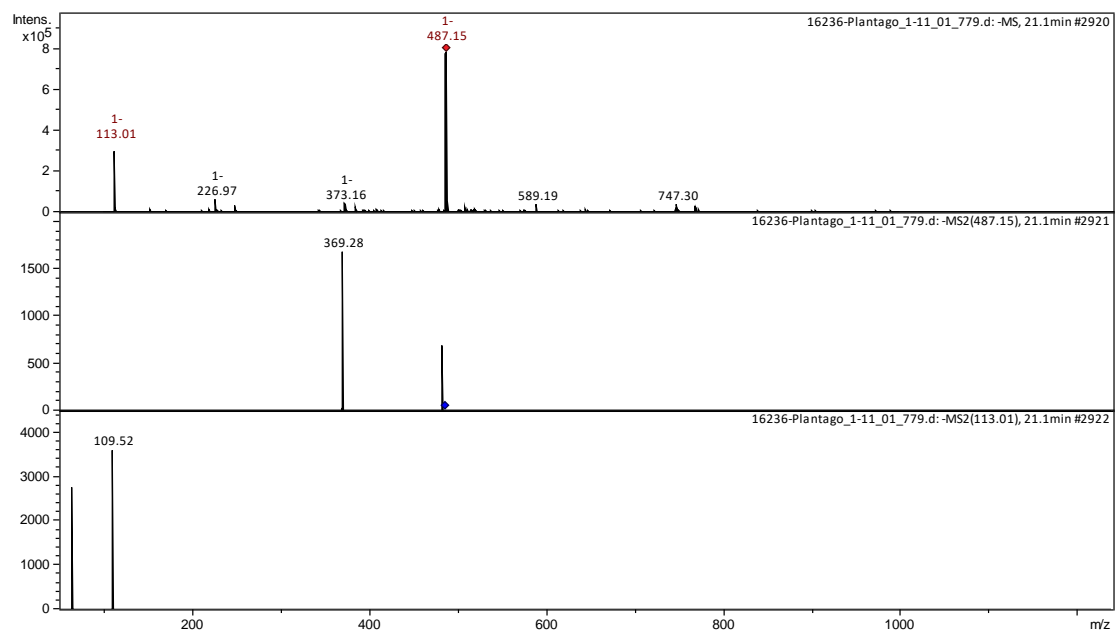


Figura 267: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 21,1 minutos.

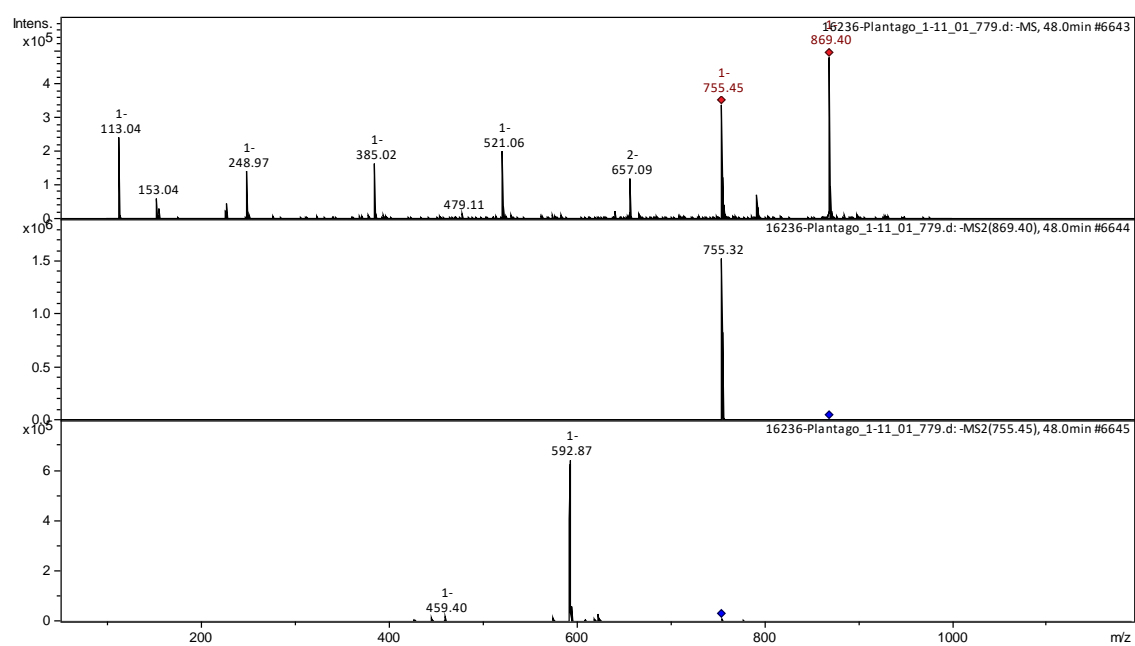


Figura 268: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 48 minutos.

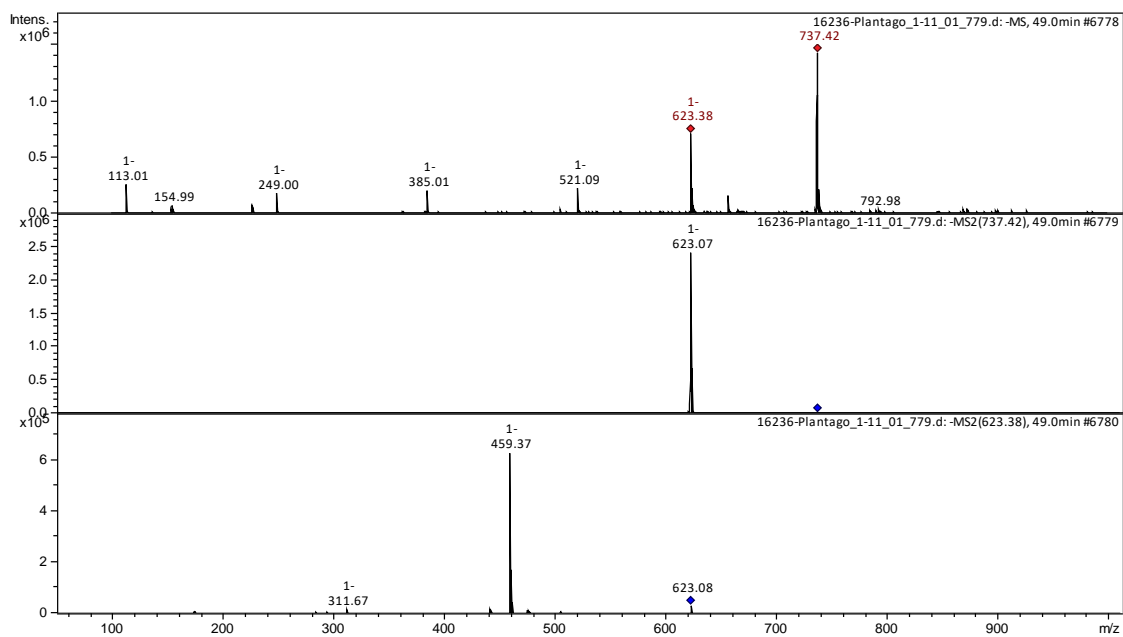


Figura 269: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 49,0 minutos.

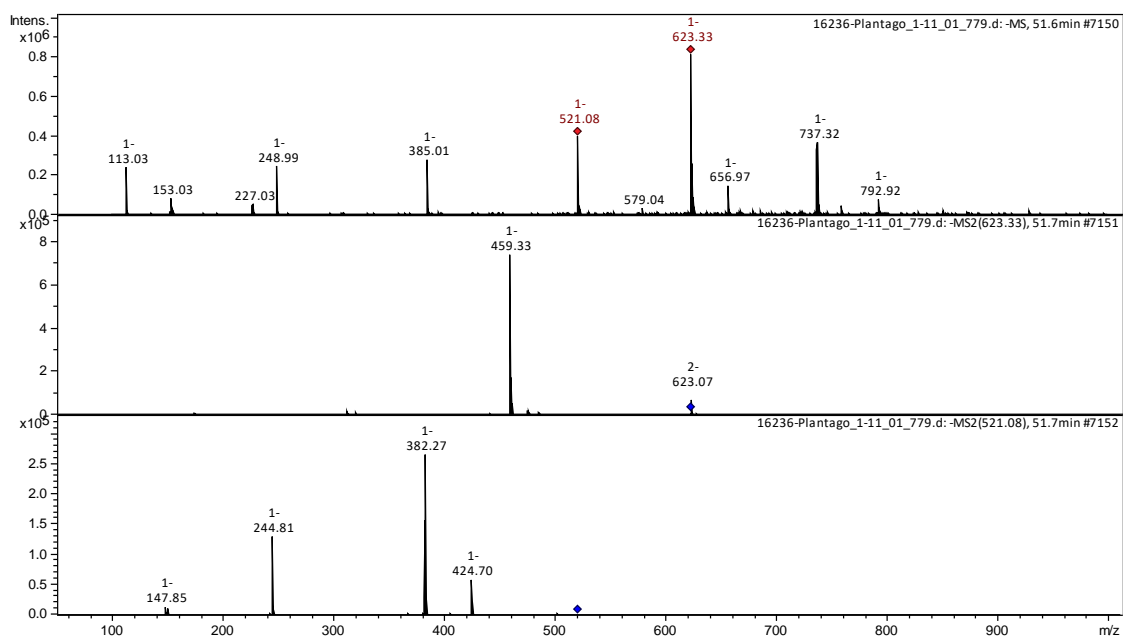


Figura 270: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 51,7 minutos.

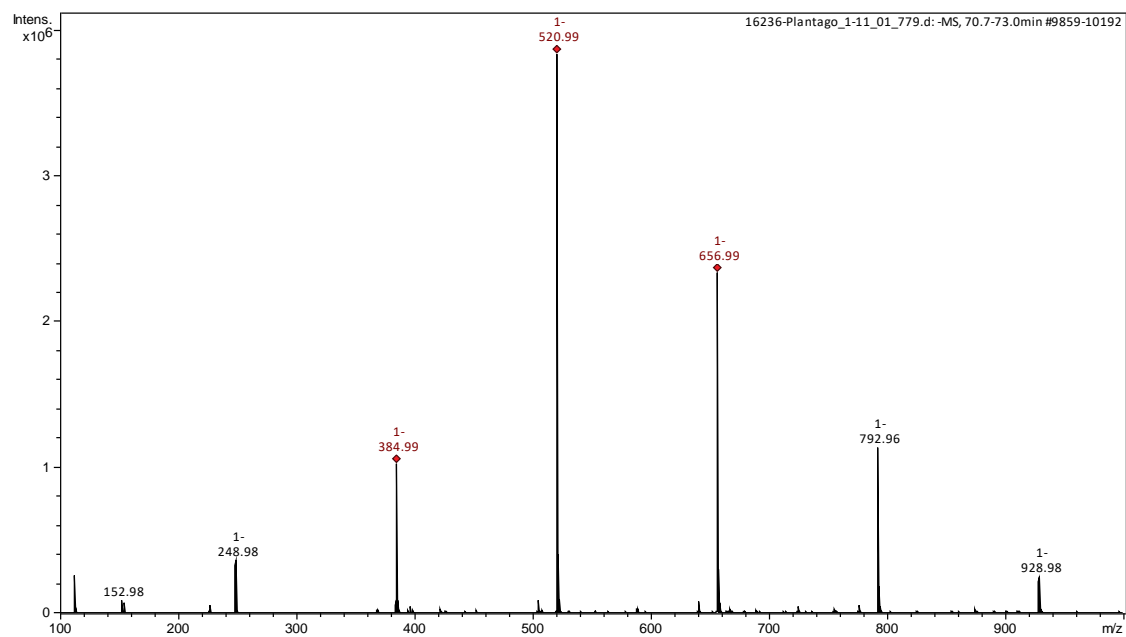


Figura 271: Espectro de massa de *Plantago ovata* Forssk obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 70,7-73,0 minutos.

12.5 Apêndice E

Espectros de massa de *Cassia angustifolia* obtido em **Espectrômetro de massas: Amazon Speed ETD**, Capillary: 4500V, Nebulizer: 27 psi, Dry Gas: 12 l/min, Dry Temp: 300 °C.

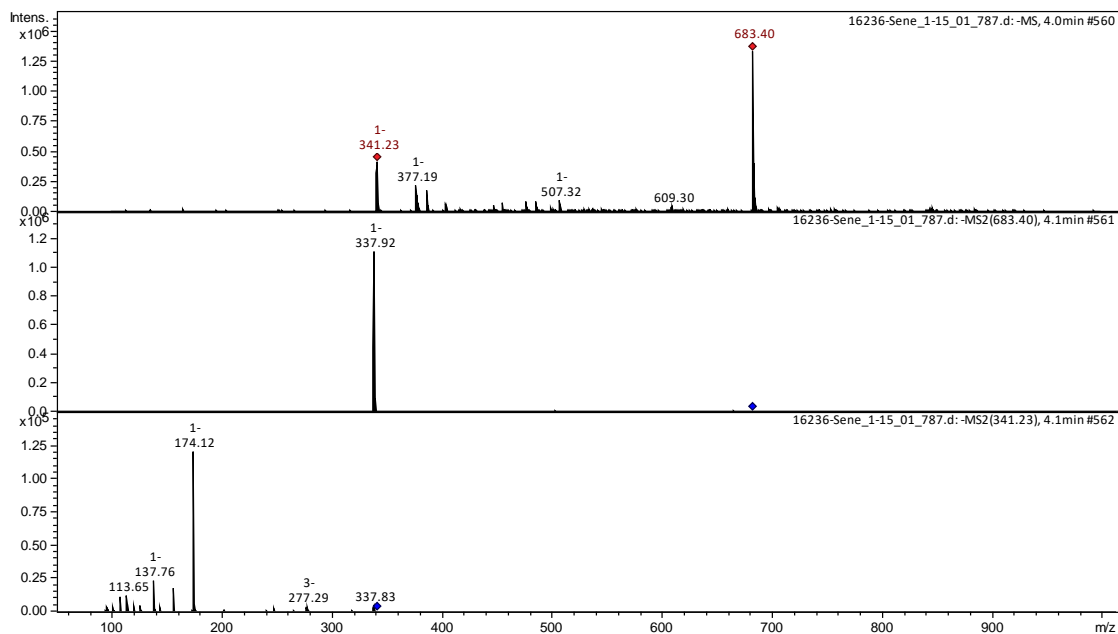


Figura 272: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 4,1 minutos.

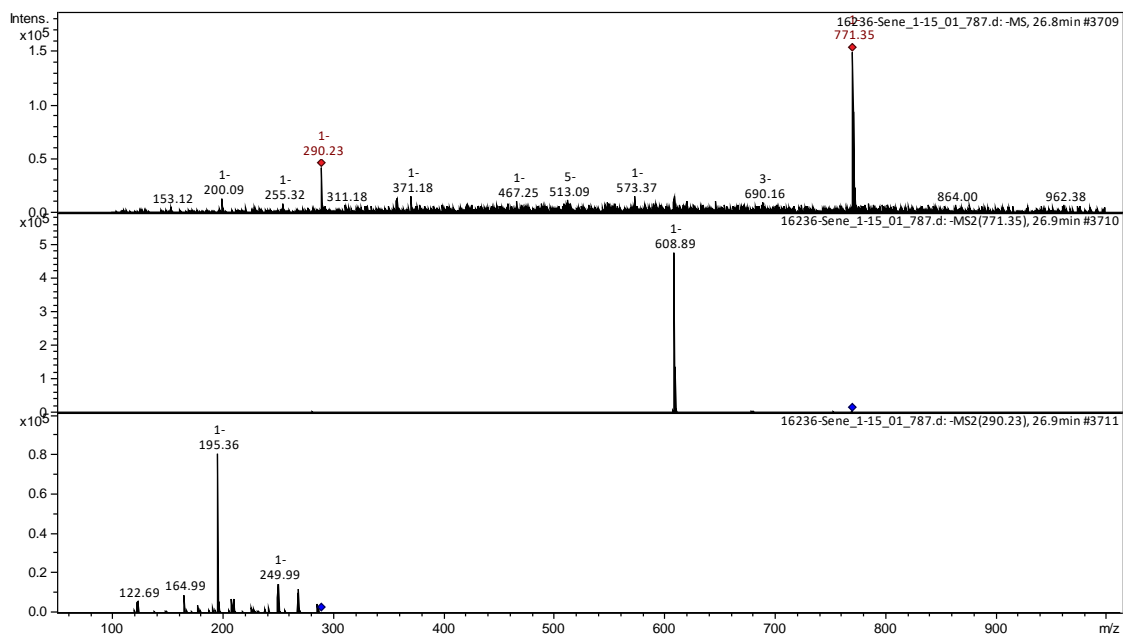


Figura 273: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 26,9 minutos.

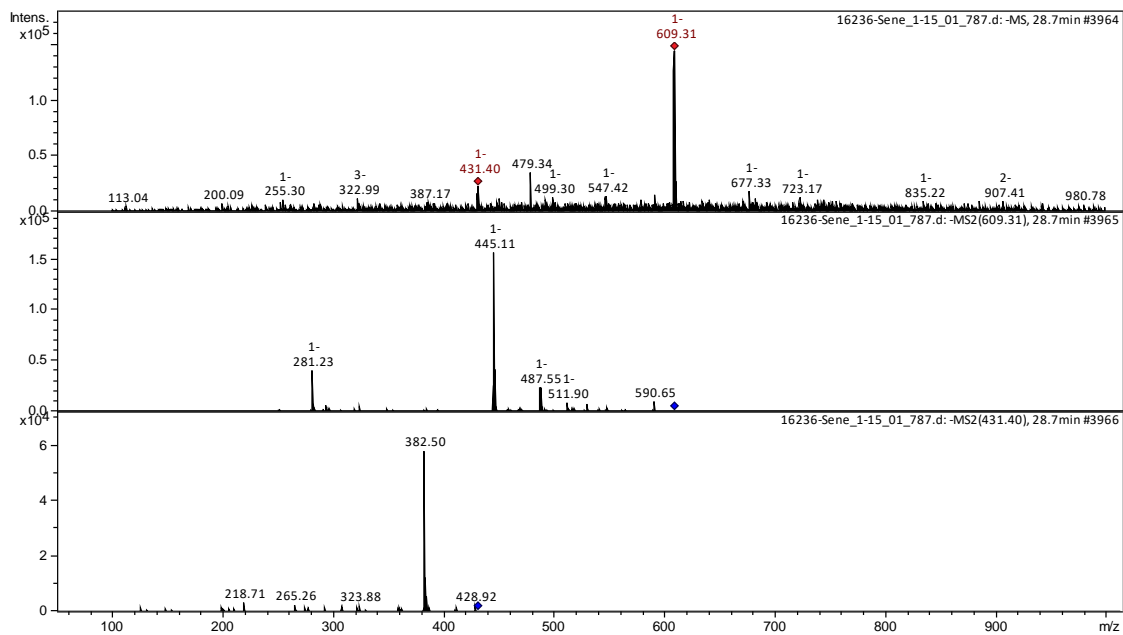


Figura 274: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 28,7 minutos.

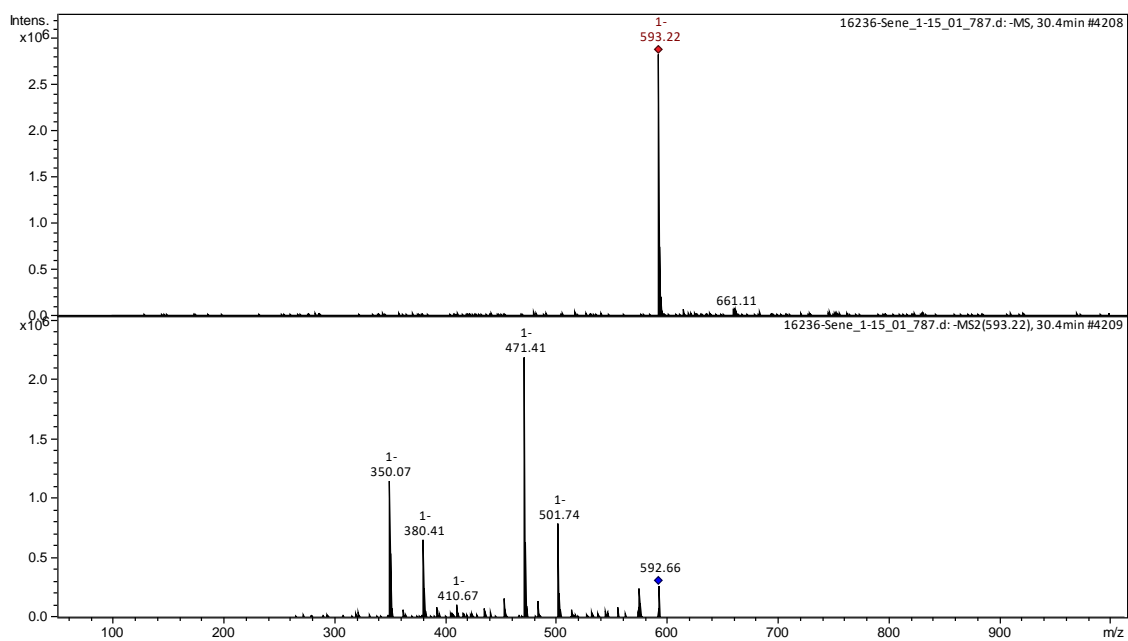


Figura 275: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 30,4 minutos.

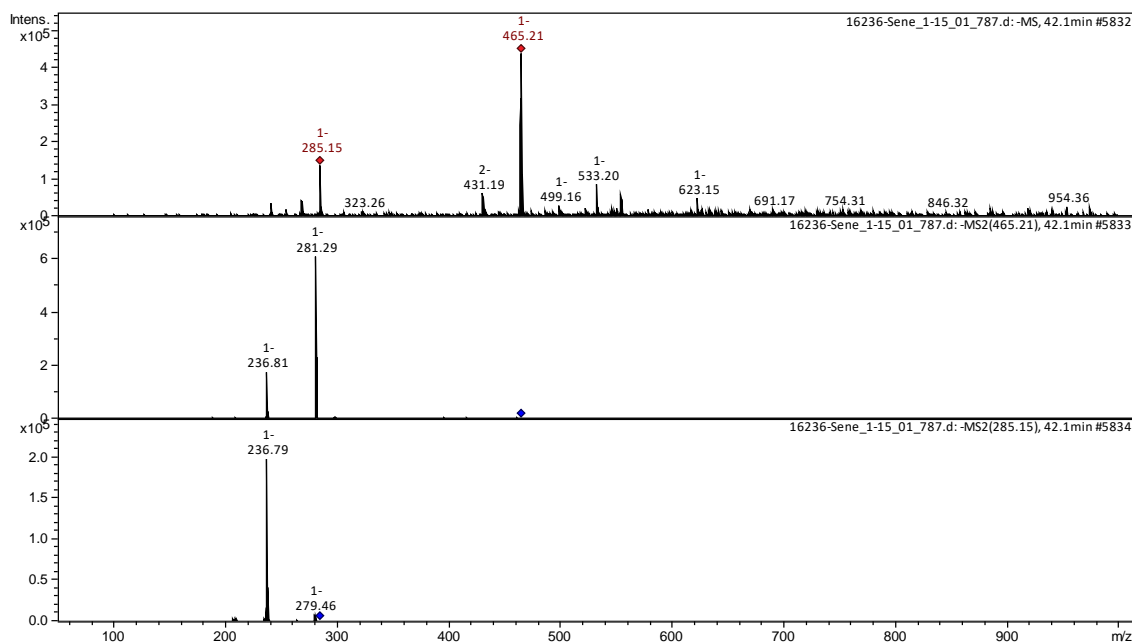


Figura 276: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 42,1 minutos.

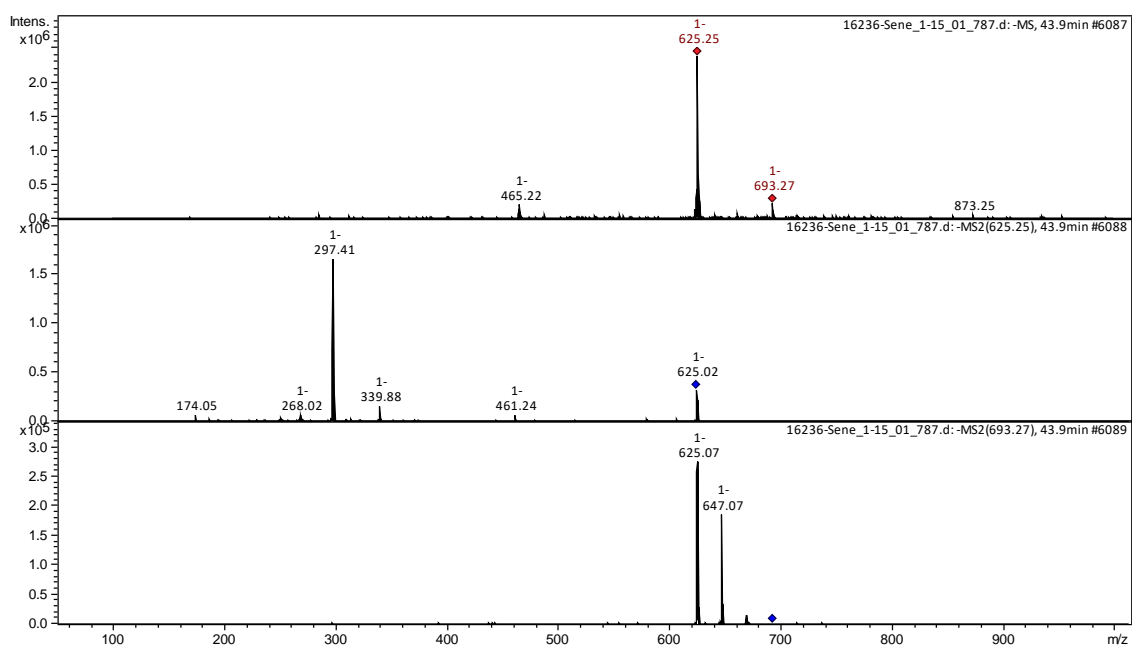


Figura 277: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 43,9 minutos.

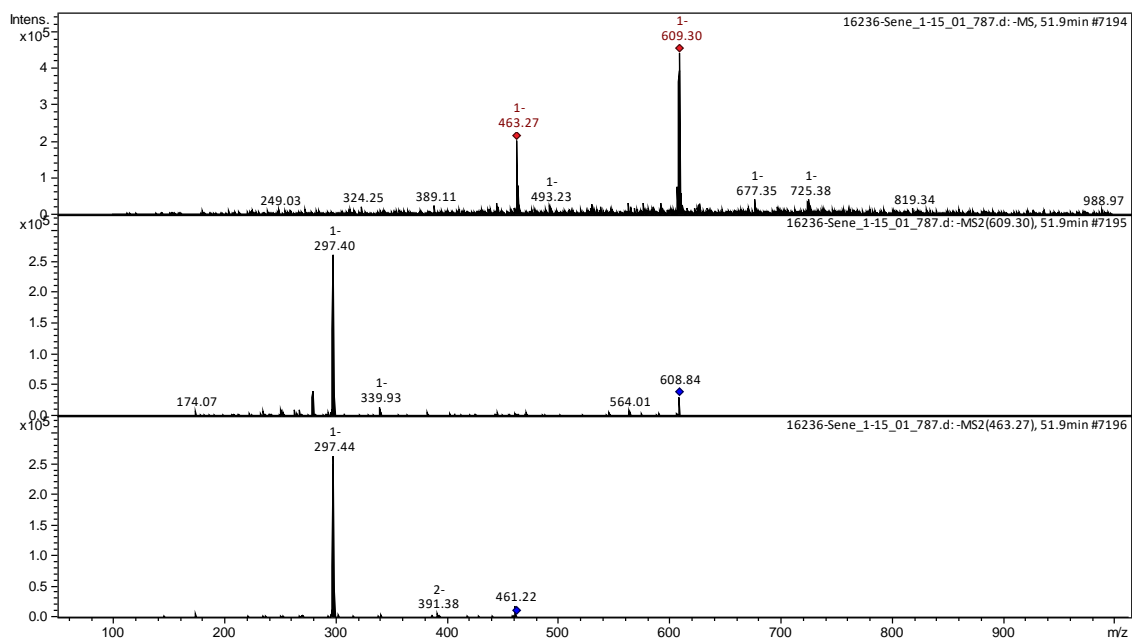


Figura 278: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 51,9 minutos.

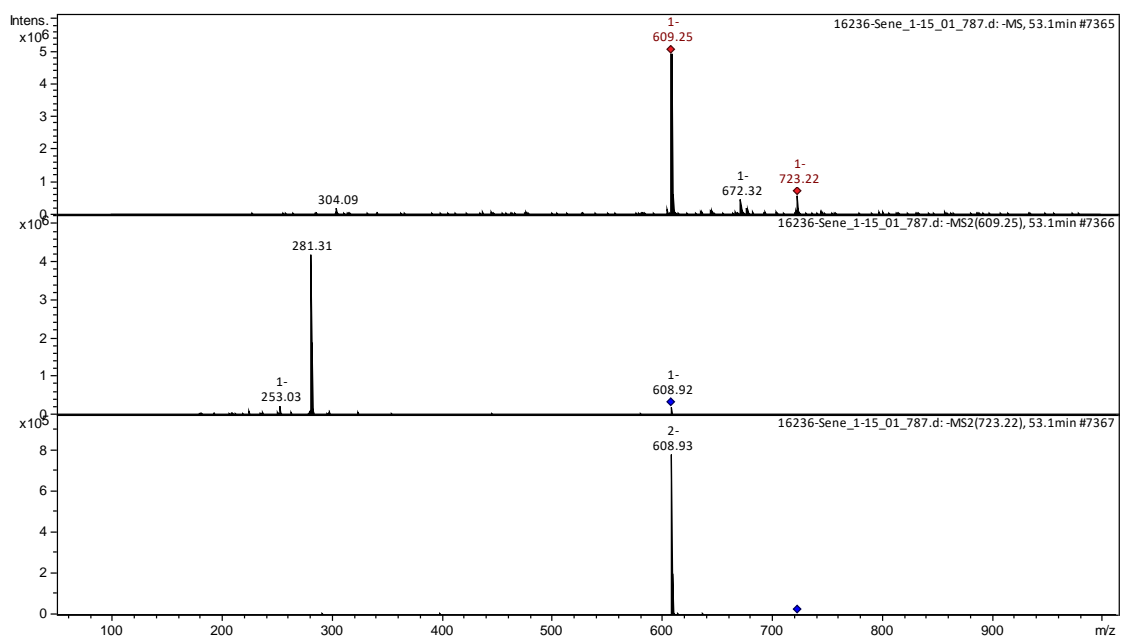


Figura 279: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 53,1 minutos.

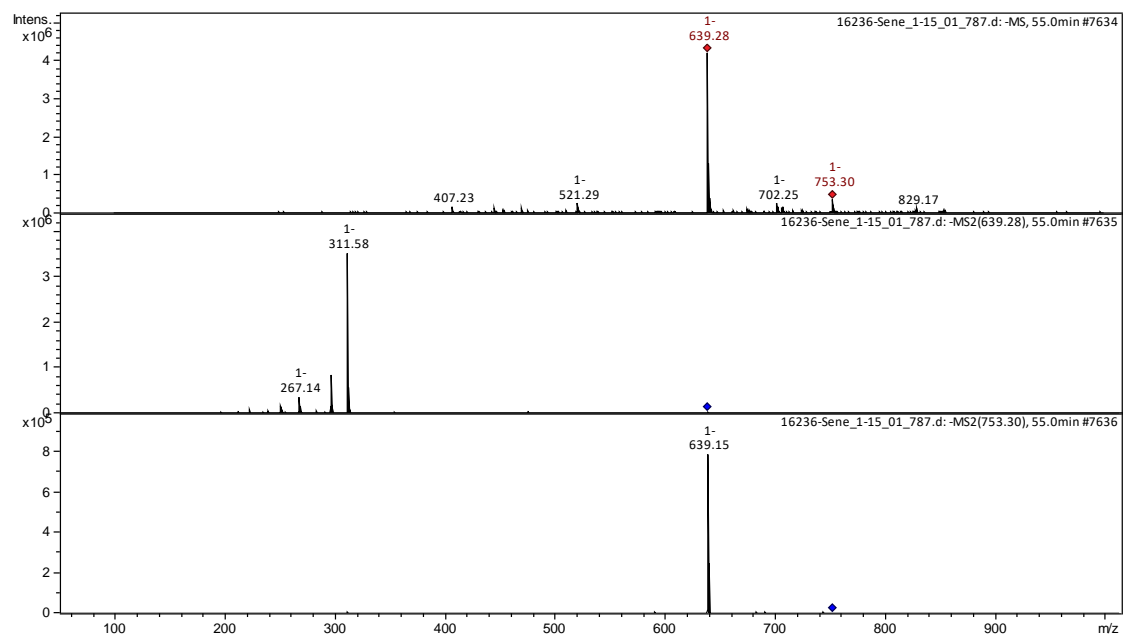


Figura 280: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 55,0 minutos.

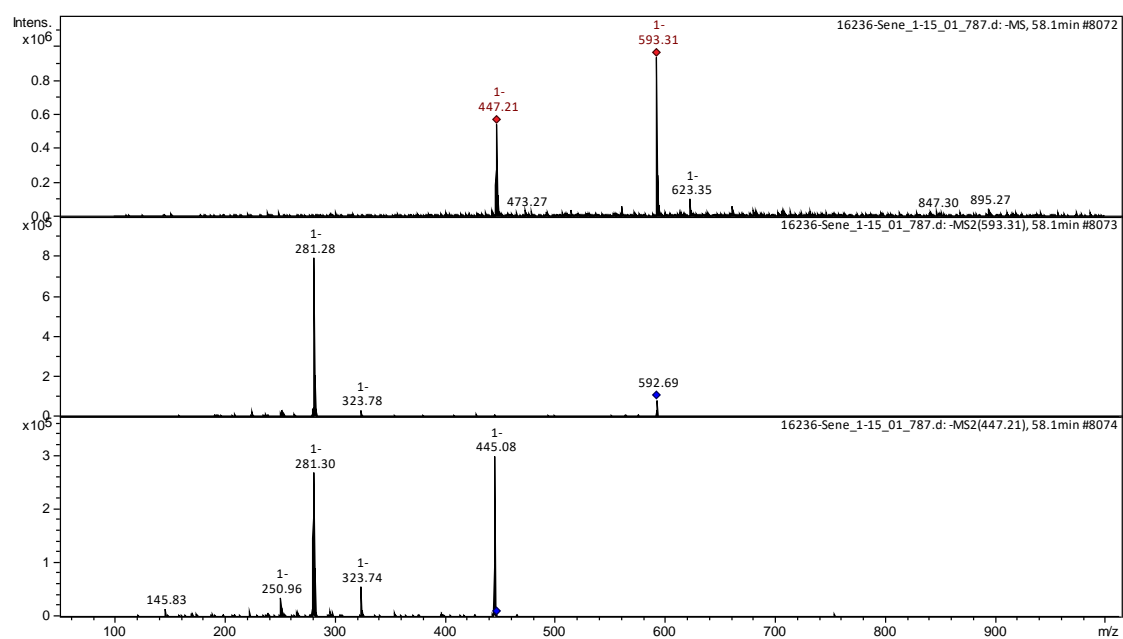


Figura 281: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 58,1 minutos.

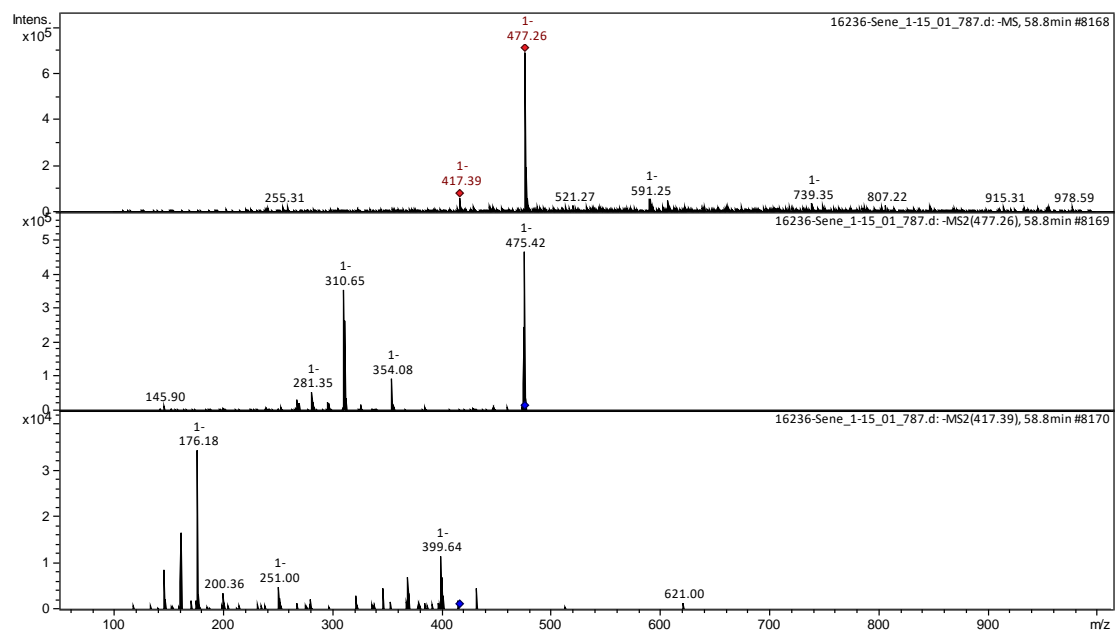


Figura 282: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 58,8 minutos.

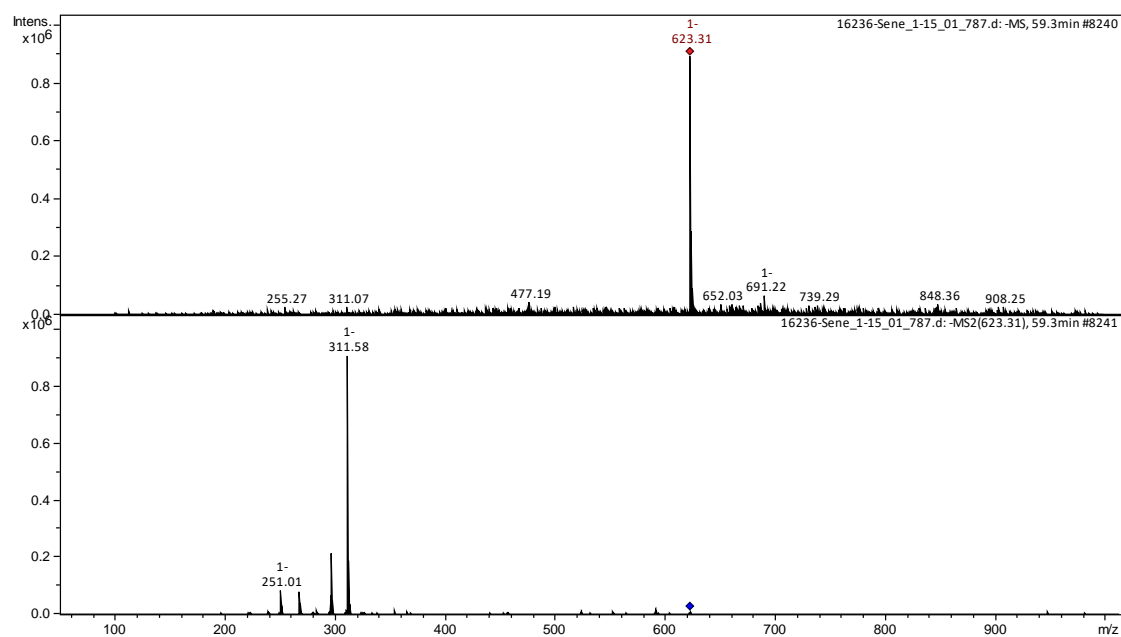


Figura 283: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 59,3 minutos.

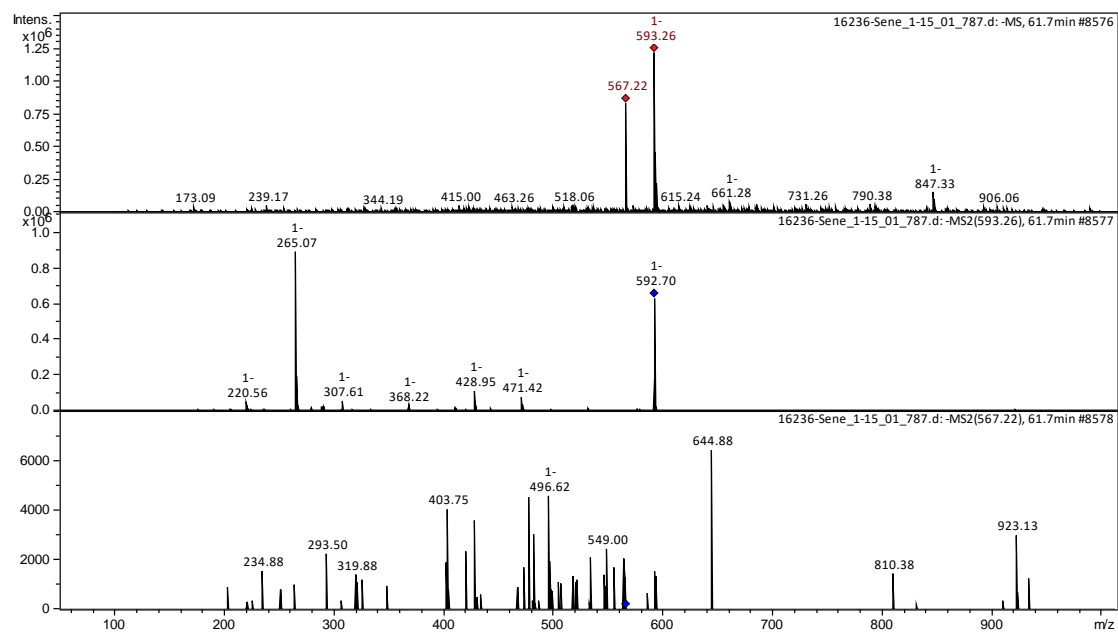


Figura 284: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 61,7 minutos.

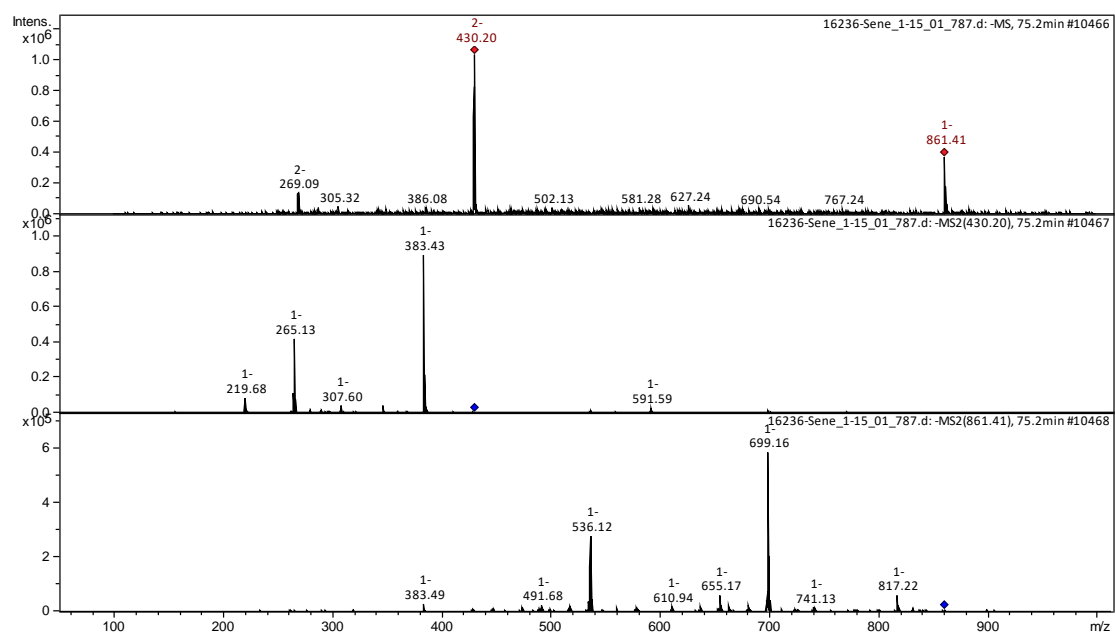


Figura 285: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 75,2 minutos.

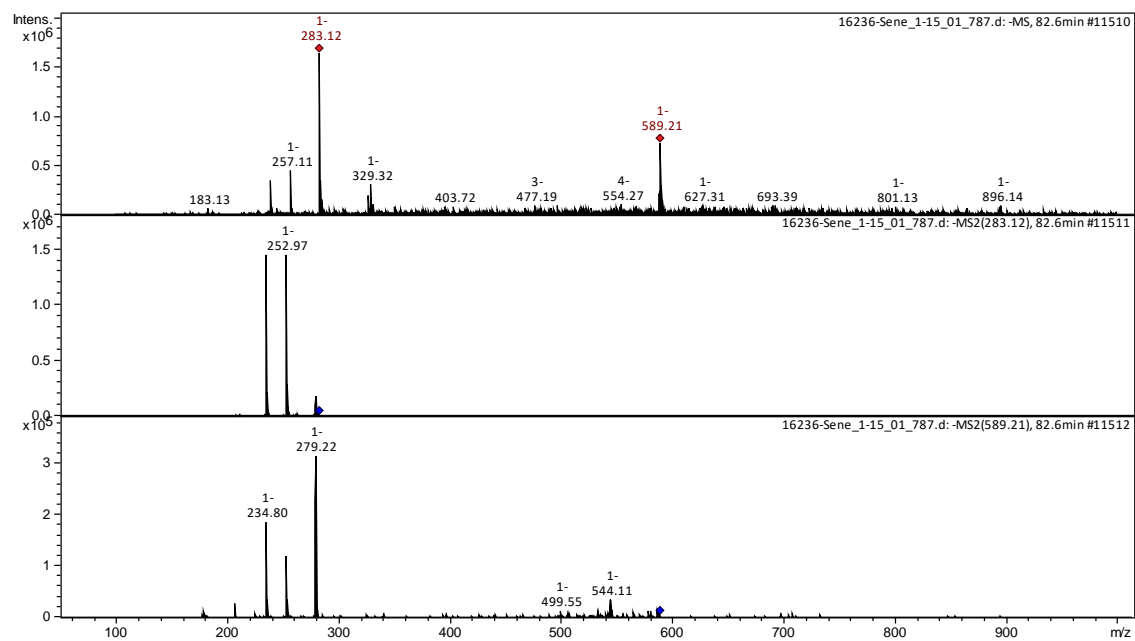


Figura 286: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 82,6 minutos.

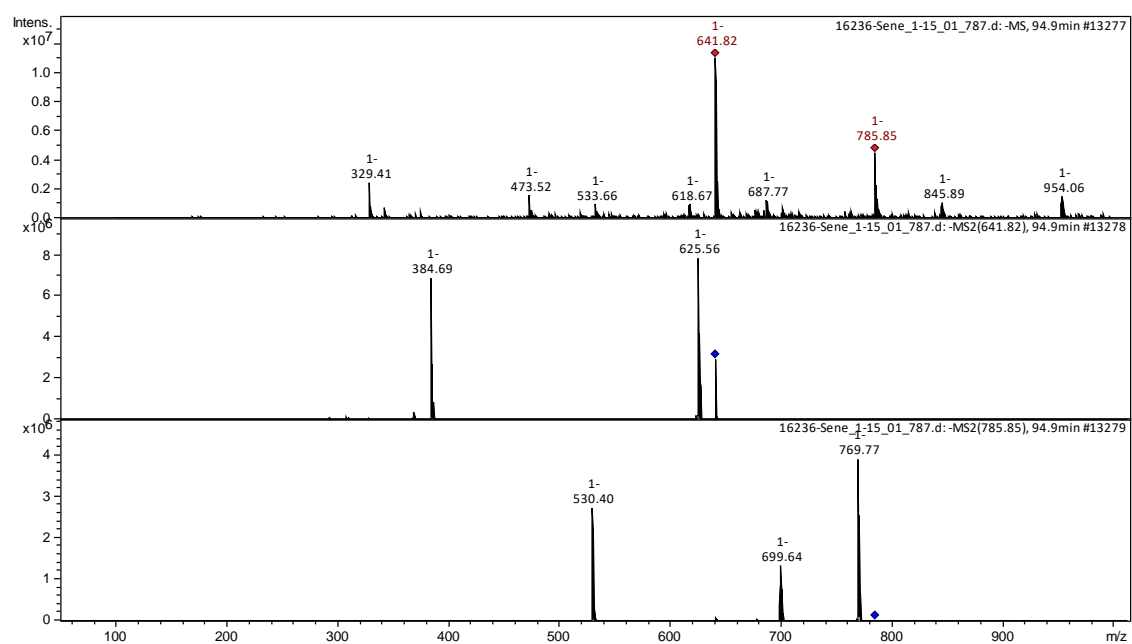


Figura 287: Espectro de massa de *Cassia angustifolia* obtido para pico presente em cromatograma no tempo de retenção de 94,4 minutos.