UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

MARIA CRISTINA DICIAULA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E VALIDAÇÃO DE DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE EXTRATOS DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

MARINGÁ

2012

MARIA CRISTINA DICIAULA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E VALIDAÇÃO DE DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE EXTRATOS DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador:

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

MARINGÁ

2012

MARIA CRISTINA DICIAULA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E VALIDAÇÃO DE DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS DE EXTRATOS DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 04 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Dra. Ieda Spacino Scarminio

Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre

Aos meus pais, Sandra e Carlos DiCiaula;
pelo amor incondicional.
Ao meu irmão Duílio DiCiaula;
por ser uma grande alegria.
Ao meu noivo Douglas Campos,
pelo amor, paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir existir nessa vida e realizar o que vim fazer.

À minha família por me gerar, criar, amar e me fazer seguir com meus sonhos.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por sua orientação, confiança, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela co-orientação, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre pela enorme ajuda prestada na confecção das lâminas e nas suas leituras.

À Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio pelo auxílio no planejamento de experimentos de misturas e análise estatística.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Fernanda Giacomini Bueno, Renata Longhini, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Maísa Almeida Leite, Vanessa Marquito Munhoz e Gisely Cristiny Lopes.

Ao Admir Arantes e Cláudio Roberto Novello pelo auxílio técnico no laboratório.

À Rafaela Paim, Tamy Suehiro e Francielle Garcia pela colaboração no projeto, apoio e amizade.

Aos amigos do programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Mônica, Sheila, Frederico e Thays.

A todos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos, principalmente às Professoras Dra. Mara Lane C. Cardoso, Selma Lucy Franco, Andréa Diniz e ao Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi.

À Helena pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Universidade Estadual de Maringá pela possibilidade de estudo e a formação como Farmacêutica Industrial.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher".

Cora Coralina

RESUMO

Schinus terebinthifolius Raddi é uma árvore típica das caatingas nordestinas, encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, além do Paraguai e Argentina. Na medicina popular, suas cascas são empregadas devido à sua ação adstringente, tônica e estimulante, além da ação antimicrobiana e regeneradora dos tecidos. Este trabalho objetivou realizar o controle de qualidade da droga vegetal e de extratos, desenvolver metodologia analítica para o doseamento de polifenóis totais (PT) e avaliar a capacidade antioxidante dos extratos secos de *S. terebinthifolius* obtidos por um modelo matemático Simplex Centroide e validar a metodologia analítica seguindo os requisitos exigidos pela RE 899/2003 – ANVISA, do extrato que demonstrasse os melhores resultados. Na pré-validação do doseamento de PT foram determinadas as seguintes condições: o pirogalol é a substância de referência; o reagente carbonato de sódio anidro deve ser utilizado na concentração de 14,06%; o tempo de análise de 5 min e comprimento de onda de 780 nm. O controle de qualidade para a droga vegetal (DV) foi realizado seguindo parâmetros farmacopeicos, como perda por dessecação (PD), resíduo seco (RS) de 11 soluções extrativas, análise granulométrica (AG) e teor de polifenóis totais (PT). Para o controle de qualidade dos extratos foram avaliados quanto o rendimento (R), teor de PT e atividade antioxidante frente ao radical DPPH (AA). Os resultados obtidos para a DV foram: PD=9,65±0,19 (CV%=2,06), diâmetro médio da partícula de 0,44 mm, o RS da solução extrativa água: etanol: acetona 4:1:1 foi de 2,39±0,01 (CV%=0,75) e PT=8,22±0,34 (CV%=4,19). O extrato que demonstrou os melhores resultados foi o água:etanol:acetona, 1:1:1 v/v (número 7) , com R=22,72%, PT= 29,91±1,05 (CV%=3,73) e AA=6,61 µg/ml ±0,30 (CV%=4,58). O extrato número 7 foi comprovado pelo modelo matemático Simplex Centroide como o que demonstrou melhores resultados e esse é o sugerido para a avaliação analítica. A validação da metodologia analítica do extrato número 7 foi realizada por espectrofotometria UV-VIS e comprovou que o método é linear, preciso, exato, seletivo e específico, segundo as normas da ANVISA.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, polifenóis totais, simplex centróide, validação por UV/Vis, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius Raddi is a typical tree of the northeastern caatinga,found from Ceará to Rio Grande do Sul, as well as Paraguay and Argentina. In folk medicine, its barks are used due to its astringent action, tonic and stimulant, as well as antimicrobial and regenerating tissue. According to the importance of this specie, this study has aimed at quality control of drug and plant extracts, develop analytical methodology for the determination of total polyphenols (TP) for the extract, evaluate the antioxidant capacity of the dried extract of *S. terebinthifolius* obtained by a mathematical model simplex centroid and validate the analytical methodology following the requirements demanded by RE 899/2003 - ANVISA, the extract that showed the best results. In the pre-validation of the determination of TP were observed the following conditions: pyrogallol is the reference substance, the anhydrous sodium carbonate reagent must be used at a concentration of 14.06%, theanalysis time of 5 min, wavelength 780 nm. Quality control for plant drug (DV) was performed according to pharmacopoeial parameters such as loss on drying (PD), dry residue (RS) of 11 extractive solution, granulometric analysis (FA) and total polyphenol content (TP). For quality control of extracts were evaluated for yield (R), content of PT and antioxidant activity towards DPPH (AA). The results were obtained for the DV: PD = 9.65 ± 0.19 (%RSD = 2.06), average particle diameter of 0.44 mm, the RS of the extraction solution water: ethanol: acetone (4:1: 1) was 2.39 ± 0.01 (RSD = 0.75%) and PT = 8.22 ± 0.34 (RSD = 4.19%).The extract revealed that the best results is the number 7 (water: ethanol: acetone, 1:1:1, v/v), R= 22.72%, TP= 29.91 ± 1.05 (%SRD = 3.73) and AA = 6.61 mg / ml ± 0.30 (SRD% = 4.58). The extract number 7 was proved by the mathematical model simplex centroid as that showed the best results and this is suggested for analytical validation. The validation of the analytical methodology extract number 7 was performed by UV-VIS spectrophotometryand found that the method is linear, precise, accurate, selective and specific, according to standards of ANVISA.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, total polyphenols, simplex centroid validation by UV/Vis, antioxidant activity

NOTA BIOGRÁFICA



Maria Cristina DiCiaula nasceu em São Paulo, SP, no dia 29 de maio de 1988. Estudou do jardim à primeira série do Ensino Médio no Colégio Notre Dame Rainha dos Apóstolos. Em 2004, mudou-se com a família para Marília, SP, onde concluiu o ensino médio em 2005, no Colégio Sagrado Coração de Jesus. No ano de 2006, com 17 anos iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá, neste período realizou estágios no laboratório de Farmacognosia e no laboratório de Farmacotécnica da Farmácia Ensino. Atuou também como monitora da disciplina de Farmacognosia e membro do Centro Acadêmico de Farmácia Euclides Scalco. Realizou seu estágio de conclusão de curso para Farmacêutica Industrial em 2010 na Indústria Desomax® Produtos de Limpeza, em Marília. Em 2011 iniciou o curso de mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, realizando suas atividades no Laboratório PALAFITO com ênfase no desenvolvimento de metodologias analíticas para drogas e extratos vegetais.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....	23
2	Representação do local atingido pelas EROs e suas doenças associadas.....	26
3	Exemplo de tanino hidrolisável (β-1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose).....	28
4	O espaço experimental para misturas de dois componentes está limitado aos pontos sobre a reta $x_1 + x_2 = 1$.....	30
5	O espaço experimental para a mistura de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.....	31
6	Exemplo de uma superfície de resposta para todas as possíveis misturas dos componentes 1, 2 e 3.....	31
7	Exemplo de curvas de nível para as misturas possíveis dos componentes 1, 2 e 3.....	32
8	Foto superior cascas secas de *S. terebinthifolius*, escala em centímetros, em A: Cascas fragmentadas como recebidas do fornecedor, B) Cascas fragmentadas com auxílio de tesoura de poda, C) Cascas cominuídas pelo moinho de martelos.....	38
9	Simplex Centroide de 3 vértices, indicado as misturas de líquidos extratores...	40
10	Varredura de 900 a 400 nm para o EB nas diferentes concentrações de carbonato de sódio.....	50
11	Varredura de 900 a 400 nm para as substâncias de referência pirogalol, ácido tânico, catequina e ácido gálico, na concentração 14,06% de carbonato de sódio anidro.....	52
12	Varredura de 900 a 400 nm para os padrões e EB no tempo de 5 min, adicionado de carbonato de sódio anidro 14,06%.....	53
13	Estrutura química das substâncias de referências: (1) ácido gálico ($C_7H_6O_5$), (2) catequina ($C_{15}H_{14}O_6$), (3) pirogalol ($C_6H_6O_3$) e (4) ácido tânico ($C_{76}H_{52}O_{46}$).	54
14 a	Superfície de resposta para a variável rendimento na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S.terebinthifolius*.....	57
14 b	Curvas de nível para a variável rendimento na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*.....	57

15 Secções transversais da casca caulinar de *S. terebinthifolius.* Em A: detalhe da espessa periderme com camadas de células de parede espessada (cpe) em sua base; B: aspecto geral do tecido cortical; C, D e E: detalhes de um canal resinífero (cr), do tecido parenquimático com fibras obliteradas (fb), e de um raio parenquimático (ra) contendo grãos de amido (am), respectivamente. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio..... 60

16 Gráfico de distribuição granulométrica, sendo massa retida por intervalo de abertura média da malha, das cascas moídas de *S.terebinthifolius*..... 61

17 Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da droga vegetal *S. terebinthifolius*..... 61

18 a Superfície de resposta para a variável polifenóis totais na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*..... 65

18 b Curvas de nível para a variável polifenóis totais na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*..... 66

19 a Superfície de resposta para a variável concentração inibitória para DPPH (IC_{50}) na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*..... 67

19 b Curvas de nível para a variável concentração inibitória para DPPH (IC_{50}) na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*..... 68

20 Curva de calibração do pirogalol na reação com reagente Folin-Ciocalteu..... 69

21 Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol..... 71

22 Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol..... 71

23 Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta, obtidos pela relação de cindo diferentes concentrações de EB de *S. terebinthifolius* pelas absorvâncias obtidas na reação com reagente Folin-Ciocalteu..... 73

24 Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para PT das amostras de EB *S. terebinthifolius*..... 74

25 Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de *S. terebinthifolius*..... 74

26	Representação da curva de espeficidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta para PT, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de *S. terebinthifolius* + 40 µL de pirogalol e as absorvâncias obtidas pela reação com reagente Folin-Ciocalteu.....	75
27	Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB *S. terebinthifolius*.....	86
28	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de *S. terebinthifolius*.....	77
29	Representação gráfica das absorvâncias de PT na faixa de concentração linear de EB *S. terebinthifolius* acrescidas de cafeína utilizadas na determinação do teste de seletividade para reação com Folin-Ciocalteu.....	78
30	Representação gráfica das absorvâncias de PT de diferentes massas de EB *S.terebinthifolius* utilizadas na determinação do intervalo de quantificação e limite de detecção para reação com Folin-Ciocalteu.....	79
31	Curva de linearidade dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação para EB *S. terebinthifolius* na reação da reagente Folin-Ciocalteu.....	80

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma		**Página**
1	Rota de trabalho e obtenção dos extratos brutos de *S. terebinthifolius*.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Mistura de líquidos extratores que foram utilizadas para a preparação dos 11 extratos brutos de *S.terebinthifolius*.....	41
2	Comparação volumétrica entre a técnica de polifenóis anterior e a proposta pela pré-validação.....	42
3	Resultados das diferentes concentrações do reagente carbonato de sódio quanto ao tempo de estabilização e absorvância média.....	51
4	Absortividade específicas das substâncias de referência e teor de polifenóis totais aproximado no EB de *S.terebinthifolius* expressos em cada substância à 780 nm e 5 min pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.....	54
5	Fatores da técnica de doseamento de polifenóis totais comparados entre a pré-validação para o EB de *S.terebinthifolius* e as outras metodologias encontradas na literatura.....	55
6	Resultados, em porcentagem, do rendimento dos extratos secos em diferentes soluções extrativas das cascas de *S. terebinthifolius*.....	56
7	Análise granulométrica por tamisação das cascas de S. terebinthifolius.	61
8	Resultados, em porcentagem, do resíduo seco em diferentes soluções extrativas de amostras de cascas de *S. terebinthifolius*.....	63
9	Resultados, em porcentagem, do teor de polifenóis totais (PT) dos extratos secos das cascas de *S. terebinthifolius*.....	65
10	Resultados, em porcentagem, do IC_{50} dos extratos secos das cascas de *S. terebinthifolius*.....	67
11	Concentrações da substância pirogalol utilizadas e as respectivas absorvâncias nos 3 testes para a obtenção da curva de calibração.....	69
12	Análise estatística da curva de calibração do pirogalol quanto ao modelo, falta de ajuste e erro puro.....	70
13	Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizadas e as respectivas absorvâncias nos três testes para a obtenção da curva de linearidade.....	72
14	Análise estatística do teste de linearidade quanto ao modelo, falta de	73

ajuste e erro puro, onde SQ: soma quadrática dos resíduos, GL: graus de liberdade e QM: soma média dos quadrados.....

15 Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizada acrescida de substância referência e as respectivas absorvâncias médias (n=3) obtidas no teste de especificidade..... 75

16 Análise estatística do teste de espeficidade quanto ao modelo, falta de ajuste e erro puro, onde SQ: soma quadrática dos resíduos, GL: graus de liberdade e QM: soma média dos quadrados..... 76

17 Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizada acrescida de cafeína e as respectivas absorvâncias (n=3) obtidas no teste de seletividade..... 78

18 Absorvâncias de diferentes concentrações de EB de *S.terebinthifolius* obtidas na reação de Folin-Ciocalteu para PT para a determinação do intervalo de quantificação e o limite de detecção..... 80

19 Teor de Polifenóis Totais obtidos no teste de precisão com amostras de 10,98 µg/mL de EB de *S. terebinthifolius*..... 82

20 Médias das absorvâncias obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação do EB de *S.terebinthifolius* (10,98 µg/mL) na análise de PT..... 83

21 Médias das absorvâncias (n=3) obtidas no teste de robustez de EB de *S. terebinthifolius* 10,98 µg/mL na análise de PT..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butil hidróxi tolueno
CV%	Coeficiente de variação
d50	Diâmetro médio da partícula
DP	Desvio padrão do intercepto
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
EB	Extrato bruto
EROs	Espécies Reativa de Oxigênio
FAA	Formol – Ácido acético – Álcool
GL	Graus de liberdade
IC_{50}	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
min	Minutos
MS	Ministério da Saúde
p/v	Peso/volume
PT	Polifenóis totais
q	número de componentes
QM	Soma média dos quadrados
R^2	Coeficiente de correlação
s	Segundos
SQ	Soma quadrática dos resíduos
SM	Solução Mãe
u	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	19
2	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.....	22
2.1	SISTEMÁTICA VEGETAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi.....	22
2.1.1	Família ANACARDIACEAE.....	22
2.1.2	*S. terebinthifolius* Raddi.....	22
2.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	24
2.2.1	Capacidade antioxidante.....	25
2.3	PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS.....	27
2.3.1	Compostos fenólicos.....	29
2.4	PLANEJANDO EXPERIMENTOS DE MISTURAS.....	29
2.5	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	34
3	**OBJETIVOS**.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	37
4.1	MATERIAL.....	37
4.1.1	Solventes e reagentes.....	37
4.1.2	Equipamentos.....	37
4.2	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	38
4.3	PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	40
4.4	PRÉ-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	41
4.5	CONTROLE DE QUALIDADE.....	42
4.5.1	Análise da droga vegetal.....	42
4.5.1.1	Corte à mão livre.....	42
4.5.1.2	Análise granulométrica.....	43
4.5.1.3	Determinação da perda por dessecação.....	43
4.5.1.4	Determinação do teor de polifenóis totais.....	43
4.5.2	Análise dos extratos brutos.....	44
4.5.2.1	Determinação do resíduo seco.....	44
4.5.2.2	Determinação do teor de polifenóis totais.....	44
4.5.2.3	Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	45

4.6	VALIDAÇÃO DA METOLOGIA ANALÍTICA.....	45
4.6.1	Curva de calibração da substância de referência.....	45
4.6.2	Linearidade.....	46
4.6.3	Especificidade.....	46
4.6.4	Seletividade.....	46
4.6.5	Limite de detecção.....	46
4.6.6	Limite de quantificação.....	47
4.6.7	Intervalo.....	47
4.6.8	Precisão.....	47
4.6.9	Exatidão.....	48
4.6.10	Robustez.....	48
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	48
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO.....**	49
5.1	PRÉ-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	49
5.2	PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	55
5.3	CONTROLE DE QUALIDADE.....	58
5.3.1	Análise da droga vegetal.....	59
5.3.1.1	Corte à mão livre.....	59
5.3.1.2	Análise granulométrica.....	60
5.3.1.3	Determinação da perda por dessecação.....	62
5.3.1.4	Determinação do teor de polifenóis totais.....	63
5.3.2	Análise dos extratos brutos.....	63
5.3.2.1	Determinação do teor de resíduo seco.....	63
5.3.2.2	Determinação do teor de polifenóis totais.....	63
5.3.2.3	Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila	66
5.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO DE *S. terebinthifolius* Raddi.....	68
5.4.1	Curva de calibração da substância de referência.....	69
5.4.2	Linearidade.....	71
5.4.3	Especificidade.....	74
5.4.4	Seletividade.....	77
5.4.5	Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo.....	78

5.4.6 Precisão..... 81
5.4.7 Exatidão..... 81
5.4.8 Robustez..... 83
6 CONCLUSÕES..... 84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 85
ANEXO 1..... 90
ANEXO 2..... 91
ANEXO 3..... 92
ANEXO 4..... 96

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais está descrito na história da humanidade e seu uso vem desde épocas remotas. Foi através de um instinto de sobrevivência que o homem e os animais começaram com a utilização de plantas para a cura de enfermidades (CORREA et al., 2001). Nas culturas mais antigas são encontrados relatos do uso da fitoterapia nas práticas terapêuticas, tais como os descritos por Paracelso, Avicenca e Hipócrates. Estes conhecimentos adquiridos foram passados através das gerações, permitindo que o homem moderno iniciasse a busca dos mecanismos de ação e propriedades farmacológicas destas espécies (SILVA et al., 2008).

No Brasil, o uso popular de plantas medicinais iniciou-se com os índios, tendo uma contribuição dos europeus e negros e restringiu-se principalmente aos campos. Com o tempo a população urbana também passou a utilizar esta cura alternativa. Estas miscigenações contribuíram para que aumentassem os conhecimentos sobre as diversas plantas utilizadas e suas propriedades medicinais (REZENDE; COCCO, 2002).

A evolução da fitoterapia ao longo dos tempos é visível. Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter novas opções terapêuticas a partir de extratos vegetais. Isto se deve à redescoberta da população pelos medicamentos fitoterápicos e, consequentemente, ao crescente interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver novas formulações a partir de plantas medicinais há muito utilizadas pela população. Entretanto, para isso, são necessários estudos cada vez mais detalhados com cada espécie vegetal para garantir os três aspectos básicos que devem cumprir os medicamentos: eficácia, segurança e qualidade (YAMADA, 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para o tratamento de doenças em países subdesenvolvidos, aproximadamente 80% desta população utilizam plantas medicinais como alternativa (SILVA et al., 2008). Mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (WHO, 1998).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, além de ser detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração (BRASIL, 2006).

O setor de fitoterápicos possui uma grande movimentação financeira mundial. No mercado brasileiro a estimativa é de que a atração de crescimento deste setor seja de aproximadamente 11% maior que com os medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico, sendo que 25% destas são originadas de plantas superiores (BALANDRIN, 1993). Além disso, as plantas medicinais têm despertado interesses crescentes na indústria farmacêutica, pois representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL; WANI, 1996).

No Brasil, após anos de discussão sobre a necessidade da implantação de uma política nacional de medicamentos fitoterápicos, chegou-se à Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS, e nesta relação encontra-se a *S. terebinthifolius* Raddi (aroeira – da - praia) (BRASIL, 2011).

As espécies vegetais foram pré-selecionadas por regiões que referenciavam seu uso por indicações de uso e de acordo com as categorias do Código Internacional de Doenças (CID-10). Essa parte inicial do trabalho foi realizada por técnicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Saúde (MS), profissionais de serviços e pesquisadores da área de plantas medicinais e fitoterápicos, vinculados à área da saúde, representando as diversas regiões brasileiras. A partir desta pré-seleção foram excluídas espécies exóticas e as que constam da lista de espécies “da flora brasileira ameaçadas de extinção”, do Ministério do Meio Ambiente (IN nº 6/2008), finalizando assim a RENISUS (BRASIL, 2006).

O Ministério da Saúde espera que os pesquisadores e o setor produtivo interajam para estudar as espécies e gerar produtos de interesse ao SUS, pois só assim serão garantidos à população plantas medicinais e fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia, como também a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Espera-se que a academia, os centros de pesquisas e o setor produtivo possam retornar com as respostas dos estudos complementares não existentes e com um produto a ser agregado ao Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006).

Entre as muitas espécies de uso popular, *S. terebinthifolius* Raddi, também conhecida como aroeira - vermelha ou aroeira – da - praia (SOUZA; LORENZI, 2005), é utilizada na clínica ginecológica. Pertencente à família Anacardiaceae, *S. terebinthifolius* tem distribuição predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, ocorrendo também nas regiões temperadas (JOLY, 2002). As cascas, por serem depurativas e febrífugas, têm ação imediata e enérgica sobre as hemoptises e afecções uterinas em geral. As folhas têm ação antireumáticas além de valioso remédio na cura de

úlceras e feridas, entre outras aplicações medicinais. Os ramos novos servem para os mesmos fins e também são empregados na limpeza e branqueamento dos dentes. Aos frutos atribui-se propriedade diurética (CORRÊA, 1984). É uma planta medicinal amplamente utilizada na região Nordeste do Brasil para tratamento de diversas infecções. O decocto das cascas do caule tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e corrimento genital (SANTOS; AMORIM, 2002).

Dentre as vaginites, a vaginose bacteriana é o tipo mais comum em mulheres na idade reprodutiva (DECENA et al., 2006). Geralmente a ocorrência de vaginite está associada à presença de *Candida* spp. Estima-se que 75% das mulheres já apresentaram uma infecção por *Candida* uma vez durante a vida e 40-50% apresentaram dois ou mais episódios (PITSOUNI et al., 2008).

Dentre a variedade de tratamentos empregados para as vaginites, destaca-se a administração tópica ou oral de antifúngicos. Em casos mais resistentes, é comum a associação destas duas vias de administração. No tratamento alopático, a via oral é preferida devido à facilidade de administração e redução no tempo de tratamento (PITSOUNI et al., 2008).

No que se refere à medicina popular, uma variedade de plantas medicinais são empregadas, sendo que o banho de assento, com o decocto da droga vegetal, é a forma mais comum de tratamento. Porém, em grande número de casos, observa-se que a administração do extrato vegetal provoca uma ação irritante na mucosa vaginal. Estudos foram realizados no intuito de investigar a origem das ações irritantes dos extratos de aroeira e possíveis formas de diminuir tal efeito. Alguns testes foram realizados incorporando-se o extrato a géis e cremes, e concluiu-se que, o extrato incorporado nestas formulações não apresenta efeito tóxico quando empregadas topicamente (LEAL, 1999).

Com base nestas informações e, sendo as vaginites uma das principais patologias ginecológicas, o estudo da atividade farmacológica da *S. terebinthifolius* frente a esta patologia, bem como o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura e eficaz, torna-se importante. Entretanto, para o correto processo de desenvolvimento de novas formulações, a validação de metodologia analítica para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos, matérias-primas, amostras biológicas ou produto acabado tem se tornado fundamental. A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (KRULL; STWARTZ, 1998).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL DE *Schinus terebinthifolius* RADDI

2.1.1 Família ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é representada por mais ou menos 70 a 80 gêneros e cerca de 600 espécies pantropicais, em sua maior parte; apenas poucas se distribuem nas regiões temperadas. Muitas dessas espécies são conhecidas pelos saborosos frutos e outras como plantas de boa madeira ou de substâncias usadas na indústria e na medicina (BARROSO, 1991).

Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae. Cerca de 25% dos gêneros da família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. Porém, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae (CORREIA et al., 2006).

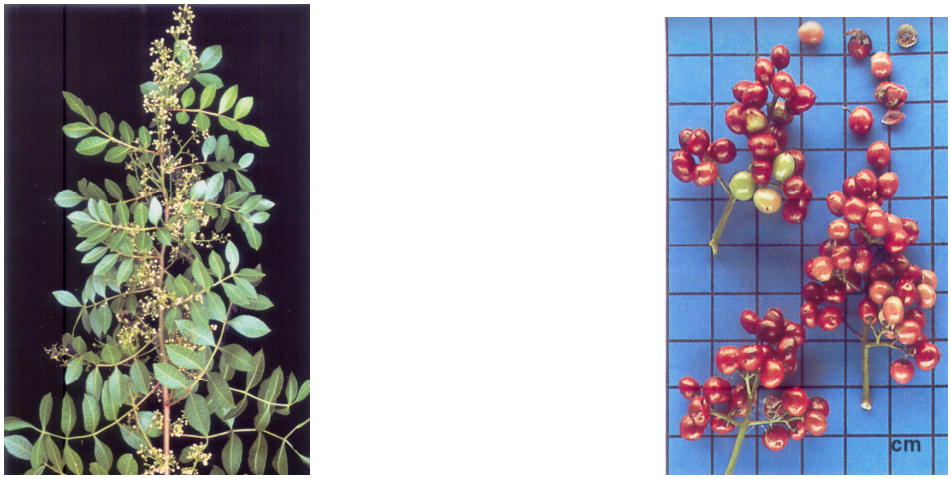
Diversas Anacardiaceae apresentam frutos ou pseudofrutos comestíveis. Este é o caso do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), cujo fruto produz a castanha-de-caju. Outras frutas incluem a manga (*Mangifera indica* L.), os cajás (*Spondias* spp. L.), o umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) e a seriguela (*Spondias purpurea* L.). Pertencem ainda a esta família o pistache (*Pistacia vera* L.) e diversas espécies que produzem madeira de boa qualidade, incluindo o goçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.), o guarita (*Astronium graveolens* Jacq.), a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), a aroeira-branca (*Lithraea molleoides* Engl.) e a braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). Algumas espécies são utilizadas na ornamentação de ruas e praças, como a aroeira-vermelha (*S. terebinthifolius* Raddi), o charão (*Rhus succedanea* L.), e a aroeira-salsa (*S. molle* L.). O peito-de-pombo (*Tapirira guianensis* Aubl.) é certamente a mais comum espécie nativa de Anacardiaceae, ocorrendo em quase todas as formações florestais do Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005).

2.1.2 *S. terebinthifolius* Raddi

S. terebinthifolius Raddi está presente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 1929), onde estão descritas sua caracterização, aspectos microscópicos e a parte utilizada: suas cascas na forma de tintura e extrato fluido. No Brasil, já era utilizada pelos nativos antes mesmo da chegada dos colonizadores brancos. É uma árvore de pequeno porte, de espécie perenifólia, proveniente da América do Sul, nativa no Brasil,

Paraguai e Argentina. A árvore pode ser encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, sendo típica das caatingas nordestinas indicada para a recuperação de áreas degradadas e arborização. Destaca-se por ser utilizada na medicina popular, como adstringente, tônica e estimulante, com ação antimicrobiana e regeneradora dos tecidos (SANTOS et al., 2004).

Figura 1 - Folhas e frutos de *S. terebinthifolius* Raddi, com autorização. (LORENZI, H.; MATOS, F.J.A., 2008).



A aroeira tem outros nomes populares tais como: aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira–da-praia, aroeira-do-brejo, aroeira-rasteira, aroeira-do-campo, coração-de-bugre, bálsamo, fruta-do-sabiá, aroeira-de-sabiá, aguaraíba, aroeira-do-sertão, cabuí e cambuí (RIBAS et al., 2006).

É uma planta com forte aroma de terebintina, de 5 a 10 m de altura, dotada de copa arredondada. Tronco tortuoso, de 30 a 60 cm de diâmetro, com casca grossa e fissurada. Suas folhas são compostas imparipinadas. Folíolos subcoriáceos, glabros, em número de 3-10 pares, de 1–5 cm de comprimento por 1–3 cm de largura.

A madeira de *S. terebinthifolius* Raddi é moderadamente pesada, de textura média, bastante resistente e de grande durabilidade natural (LORENZI, 2000).

Segundo Santos e colaboradores (2002) além de sua aplicação como fitomedicamento, o interesse por *S. terebinthifolius* se dá pelo seu metabolismo secundário que produz entre outras substâncias, flavonoides, taninos e óleos essenciais, com aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e perfumaria.

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Corrêa (1984) destaca a aroeira como adstringente, tônica, estimulante e antinevrálgiva, mas com emprego restrito, pois se trata de uma espécie tóxica e que deve ser utilizada com precaução. As cascas possuem ação depurativa e febrífuga, com ação imediata sobre hemoptises e afecções uterinas.

As partes utilizadas de *S. terebinthifolius* que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É considerada pela medicina popular como adstringente, antidiarreica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga, das cascas se extrai um óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (DEGÁSPARI et al., 2004). Devido à composição de seus óleos essenciais é utilizada no tratamento de distúrbios respiratórios.

O decocto da casca do caule tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e corrimento genital (SANTOS; AMORIM, 2002).

Segundo Matos (2000), um estudo clínico com tampões assépticos do extrato hidroalcoólico realizado com 100 mulheres portadoras de cervicite e cervicovaginite comprovou a eficácia do tratamento tópico por meio de tampões assépticos, com a cura de todos os casos no período de tratamento que variou de uma a três semanas.

A presença de substâncias tais como terebintona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebintifólico e o ácido ursólico são responsáveis pela ação antimicrobiana de *S. terebinthifolius.*

Lima et al. (2004) avaliaram o potencial da ação antimicrobiana do extrato aquoso de *S. terebinthifolius*, sendo utilizado como substrato de extração o caule e folhas. Este extrato mostrou atividade frente a *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Bacillus cereus e Pseudomonas aeruginosa* e atividade inibitória do crescimento de *Trycophyton rubrum, Microsporum canis, Epydermophyton floccosum* e *Candida albicans*.

Lima e colaboradores (2006) demonstraram que o extrato de aroeira incorporado em um medicamento demonstrou uma atividade significativa na promoção da cura de lesões cutâneas.

Como controle biológico, o óleo essencial das folhas de aroeira, foi classificado como potente na ação inseticida contra *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, os quais são pragas do feijão (SANTOS, A.C.A., 2007).

2.2.1 Capacidade antioxidante

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo fisiológico natural do organismo (endógeno), mas também pode estar associado a exposição por agentes ambientais (exógenos). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico,o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente aceitando quatro elétrons e resultando na formação de água. No entanto, durante este processo são formados compostos intermediários, as EROs, que se dividem em grupos radicalares como superóxido (O2•-), hidroxil (HO•), peroxil (ROO•), alcoxil (RO•) e também os não - radicalares como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio (SEIFRIED et al., 2007; VICENTINO; MENEZES, 2007).

O radical hidroxil é o que provoca maior dano ao organismo, por apresentar uma meia-vida curta, sendo difícil de ser sequestrado *in vivo*. Este radical é formado a partir da reação de peróxido de hidrogênio com metais (M) de transição (cobre e ferro), presentes nas células, e também da quebra da água quando em exposição a radiação ultravioleta, radiação y e raios x, segundo as reações 1 e 2, respectivamente (BARREIROS; DAVID, 2006).

$$M_n^+ + H_2O_2 \rightarrow M_{(n+1)}^+ + HO\bullet + HO^- \quad \text{(Reação 1)}$$

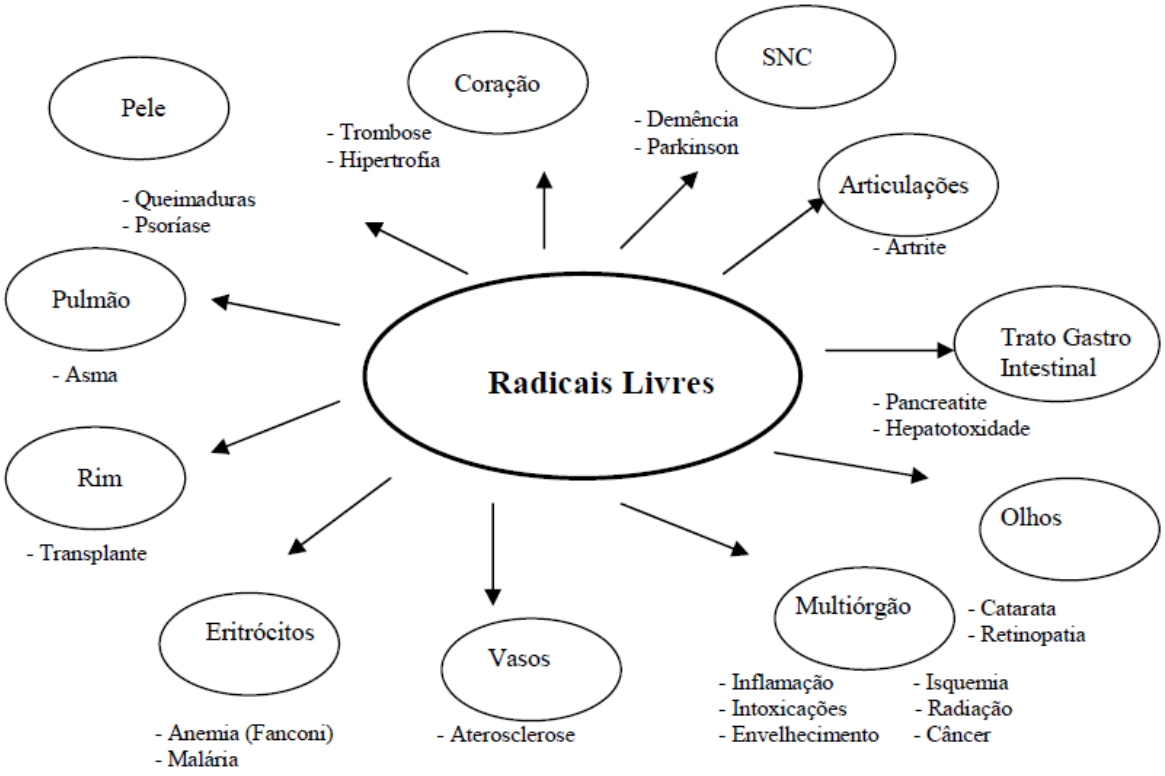
$$H_2O \rightarrow HO\bullet + H\bullet \quad \text{(Reação 2)}$$

A formação do estresse oxidativo deve-se a um desequilíbrio na taxa de produção e degradação dos antioxidantes, podendo levar a danificação de lipídios, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Estes danos estão relacionados com o desenvolvimento do câncer, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças autoimunes, alem de causar o envelhecimento precoce (Figura 2) (RATMAN et al., 2006; VICENTINO; MENEZES, 2007).

Segundo Sousa et al. (2007), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química. Quanto maior a quantidade de hidroxilas fenólicas, maior o sequestro de radicais livres (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

Substâncias fenólicas tais como flavonoides e ácidos fenólicos são considerados antioxidantes mais potentes que a vitamina C e a vitamina E (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). Por isso, há um crescente interesse em antioxidantes fenólicos presentes nas plantas medicinais e nas usadas na dieta alimentar, que podem ajudar atenuando o dano oxidativo. Estes antioxidantes naturais promovem benefícios à saúde associados à prevenção de danos causados por degeneração biológica (ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007).

Figura 2 – Representação do local atingido pelas EROs e suas doenças associadas (RENZ,2003 apud OLDONI, 2007).



Estudos têm demonstrado que polifenóis naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstraram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e o consumo de alimentos que são fonte de substâncias fenólicas, possivelmente devido às suas propriedades antioxidantes (BROINIZI et al., 2007).

Segundo estudo de Lima e colaboradores (2006), a casca do caule de *S. terebinthifolius* apresentou ação antioxidante e a fração clorofórmica é uma fração rica em substâncias antioxidantes, com ação na mesma ordem de grandeza do padrão epicatequina-galato. El-Massry et al. (2009) compararam o extrato etanólico, óleo essencial e extrato diclorometanólico de folhas de *S. terebinthifolius* do Egito e chegaram à conclusão de que o extrato etanólico foi o mais potente frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) devido provavelmente à presença majoritária nesse extrato de compostos fenólicos.

2.3 PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS

2.3.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes, abrangendo uma grande variedade de substâncias encontradas em plantas. Dentre essas substâncias, tem-se os flavonoides, fenóis monocíclicos simples, fenilpropanoides, quinonas, ligninas, taninos, e às vezes podem-se encontrar unidades fenólicas em proteínas, alcaloides e terpenoides (HARBORNE, 1998).

Os compostos fenólicos apresentam a característica de complexação com proteínas por ligações de hidrogênio. Durante os processos de isolamento as membranas celulares são rompidas, fazendo com que todos os constituintes da planta se misturem, ocorrendo rapidamente a complexação de fenóis e proteínas resultando em uma inibição da atividade enzimática em extratos brutos de plantas. Porém, os fenóis são muito susceptíveis à oxidação enzimática por enzimas “fenolases” específicas presentes em todas as plantas, podendo haver grandes perdas de material fenólico durante os processos de isolamento. Normalmente, previne-se essa oxidação enzimática realizando a extração dos fenóis da planta com álcool em ebulição (HARBORNE, 1998).

Como todos os compostos fenólicos são aromáticos, apresentam intensa absorção na região de UV do espectro (HARBORNE, 1998; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Logo, os métodos espectrométricos são especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

Taninos são substâncias fenólicas hidrossolúveis, com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 u, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2007). Compreendem um grande grupo de substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal; em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Quando ocorrem em grande quantidade, geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

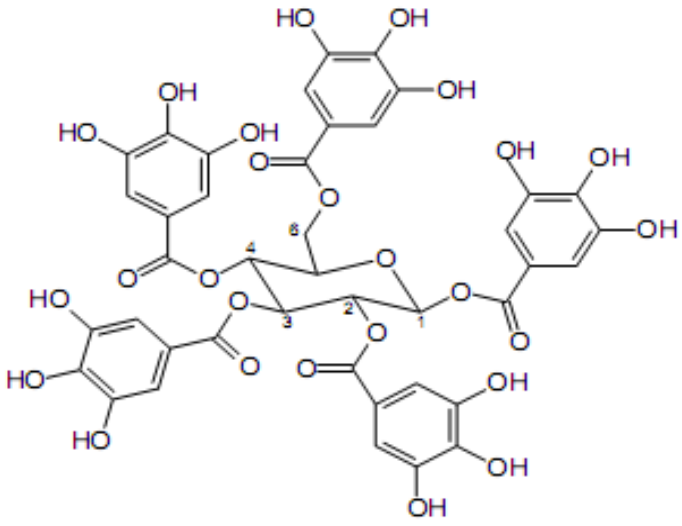
Os taninos, como na Figura 3, possuem a habilidade de se complexar com proteínas, formando copolímeros estáveis insolúveis em água (HARBORNE, 1998). Industrialmente, os taninos são utilizados na transformação de peles de animais em couro, no qual ligações são formadas entre as fibras de colágeno na pele do animal, adquirindo resistência ao calor, água e abrasivos (SANTOS; MELLO, 2007).

A adstringência é caracterizada como uma sensação de extrema “amarração” e secura na boca. Isto acontece, pois a saliva contém entre 1,0 e 3,5 mg de proteína por mL

de saliva, correspondendo de 16 a 33% de prolina. O fenômeno da adstringência deve, provavelmente, estar associada especificamente com a interação de polifenóis com as proteínas ricas em prolina (HASLAM, 1998).

Plantas com grande concentração de taninos são empregadas popularmente como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, distúrbios estomacais, distúrbios renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos estão relacionadas a três características: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e habilidade de complexação com outras moléculas (HASLAM, 1998).

Figura 3 - Exemplo de tanino hidrolisável (β-1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose).



Estudos recentes mostraram que os taninos condensados são potentes antioxidantes que funcionam como captadores de radicais livres. Compostos extraídos de sementes de uvas (*Vitis vinifera* L.) e de cortex de pinheiros (*Pinus pinaster* Soland.) são comercializados como suplementos dietéticos, acreditando-se que sejam eficazes para melhorar a circulação arteriovenosa periférica, quadros de fragilidade capilar, retinopatias, doenças inflamatórias do colágeno e outras doenças relacionadas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A ação antifúngica do *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foi avaliada por Ishida et al. (2006) demonstrando que a atividade sobre *Candida* spp., especialmente sobre *C. albicans*, é atribuída aos taninos condensados, inibindo o crescimento por afetar a

integridade da parece celular, pela modificação da hidrofobicidade da superfície celular, inibição da formação do tubo germinativo e interferência no processo de brotamento.

Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal e quando ele encontra-se sem o açúcar é chamado de aglicona ou genina e na sua forma conjugada é conhecida como heterosídeo. O emprego terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto. Têm como principais atividades: antifúngica, antiviral, anti–inflamatória, antitumoral, hormonal e proteção com raios UV (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Desde a antiguidade, plantas contendo quinonas têm sido usadas por suas fontes biológicas ou como fonte de corantes. Em geral, se aceita a teoria de que certas quinonas tenham um papel na defesa da planta contra insetos e outros patógenos. A atividade laxante é a responsável pela utilização terapêutica da maioria dos vegetais que contêm quinonas, além de atividade antifúngica, antibacteriana e antitumoral (SANTOS; MELLO, 2007).

2.4 PLANEJANDO EXPERIMENTOS DE MISTURAS

De acordo com Scheffé (1957) a teoria é desenvolvida para experimentos com misturas de *q* componentes cuja finalidade é a previsão empírica da resposta a qualquer mistura dos componentes, quando esta depende apenas da proporção dos componentes e não da quantidade total.

Considera-se experimentos com misturas, das quais a propriedade estudada depende das proporções dos componentes presentes, mas não na quantidade total da mistura. Exemplos disso são a resistência à tração de uma liga de metais diferentes, a resistência ao desgaste, devidamente definido, de uma mistura de diferentes tipos de borracha e a octanagem de uma mistura de diferentes estoques de gasolina (SCHEFFÉ, 1957). Lonni et al. (2011) planejaram uma mistura quaternária (água, etanol, acetona e metanol) para a extração de componentes das cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), conhecida como catuaba, e os extratos resultantes desse planejamento foram avaliados quanto ao rendimento, ao teor de polifenóis e atividade antioxidante.

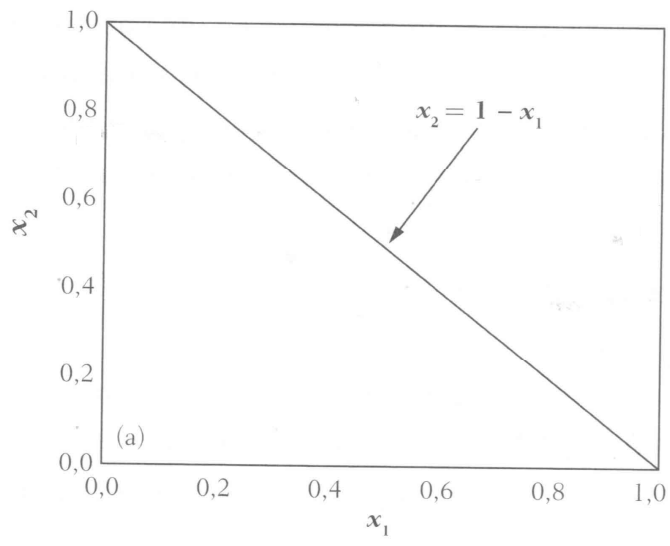
Em uma mistura de *q* componentes ($q \geq 3$), na qual x_i é a proporção (em volume ou em peso, por exemplo) do constituinte i na mistura, assim:

$$x_i \geq 0 \ (_i = 1,2 \ldots q), \qquad x_1 + x_2 + \ldots xq = 1$$

O fator espacial é então um simplex triangular quando q=3 e tetraedro para q=4. O fator espacial para experimentos com misturas é um simplex e foi noticiado em um artigo sobre a ação de hormônios. O termo simplex design é usado para a demonstração de N pontos experimentais no simplex.

Para uma mistura binária, a equação acima reduz-se a $x_1 + x_2 = 1$. Todas as possíveis misturas dos dois componentes correspondem a pontos localizados na reta formada pelo sistema de eixos abscissa e coordenada (Figura 4). No estudo de misturas, porém o espaço experimental fica restrito aos pontos da reta, ou seja, torna-se unidimensional (Barros Neto et al., 2010).

Figura 4 - O espaço experimental para misturas de dois componentes está limitado aos pontos sobre a reta $x_1 + x_2 = 1$ (BARROS NETO et al., 2010, com autorização).



Caso o sistema seja uma mistura de três componentes, porém, terá de obedecer à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, como mostrado na Figura 5.

Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e as arestas às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam misturas dos três componentes. A variação de uma dada propriedade, com a composição da mistura pode ser descrita por uma superfície de resposta como na Figura 6. Representando essa superfície por suas curvas de nível, obteríamos um diagrama triangular como da Figura 7.

- **Mistura de dois componentes**

O modelo mais simples para uma mistura de dois componentes é o modelo aditivo, ou linear:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon_i$$

onde y_i é um valor experimental da resposta de interesse, β_0, β_1 e β_2 são os parâmetros do modelo e ε_i representa o erro aleatório associado à determinação do valor de y_i.

Figura 5 - O espaço experimental para a mistura de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo (BARROS NETO et al., 2010, com autorização).

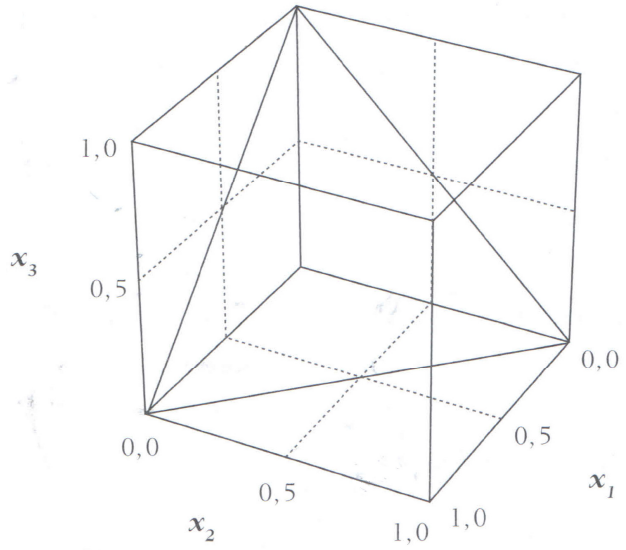


Figura 6 - Exemplo de uma superfície de resposta para todas as possíveis misturas dos componentes 1, 2 e 3.

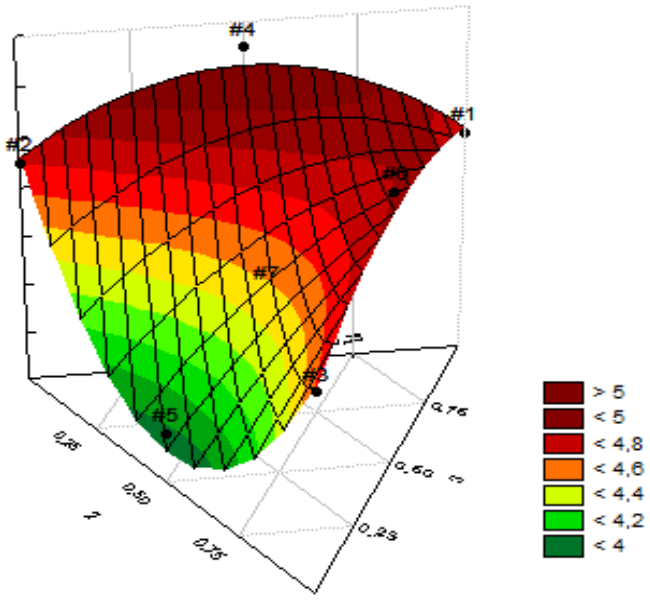
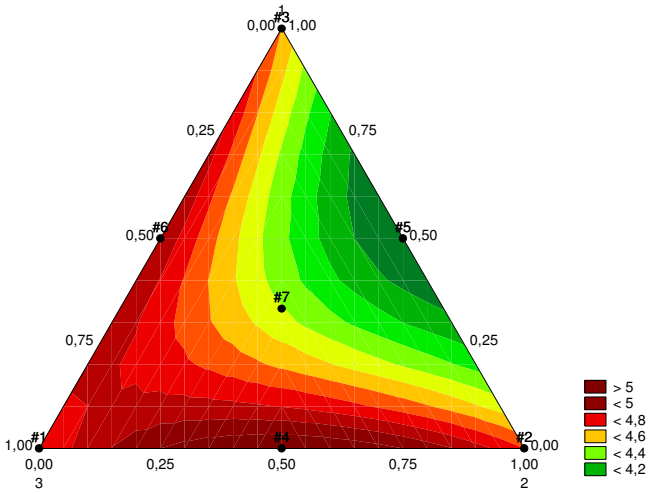


Figura 7 - Curvas de nível para as misturas possíveis dos componentes 1, 2 e 3.



Ajustando o modelo às observações feitas com essa finalidade, obtém-se a expressão:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$$

que permite estimar a resposta média num ponto qualquer de composição (x1, x2). Como a soma de x1 + x2 é sempre igual a 1, pode-se introduzi-la como coeficiente b_0 na equação acima, sem que a igualdade se altere:

$$\hat{y} = b_0(x_1 + x_2) + b_1x_1 + b_2x_2$$

Com um pequeno rearranjo tem se:

$$\hat{y} = (b_0 + b_1)x_1 + (b_0 + b_2)x_2 = b^*_1x_1 + b^*_2x_2$$

onde $b^*_i = b_0 + b_i$. Com esse artifício, o modelo passa a ter apenas dois coeficientes a serem determinados, b^*_1 e b^*_2, em vez dos três que aparecem na equação original. Para determiná-los, são necessários somente dois ensaios distintos.

Quando $(x_1,x_2) = (1,0)$, isto é quando a "mistura" contém apenas o componente 1, a equação acima reduz-se $\hat{y} = b^*_1 = y_1$, onde y_1 é a resposta observada para o componente 1 puro. Da mesma forma, quando $(x_1,x_2) = (0,1)$, tem-se $\hat{y} = b^*_2 = y_2$, ou seja, os dois coeficientes do modelo aditivo são as próprias respostas dos respectivos componentes puros. Caso o modelo seja válido, pode-se prever as propriedades de uma mistura qualquer sem ter necessitado realizar mistura alguma.

Embora os resultados obtidos com os componentes puros determinem completamente o modelo linear, é claro que se precisa realizar experimentos com misturas binárias, para verificar se o modelo é mesmo adequado. Pode ser que os efeitos da composição sobre a resposta sejam mais complicados, e um outro modelo seja necessário.

A ampliação do modelo linear é o modelo quadrático, que é definido pela equação:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Esta expressão contém seis parâmetros, mas para misturas binárias esse número se reduz, por causa da soma constante das proporções dos dois componentes. Rearranjando e fazendo substituições tem-se:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_{12}x_1x_2$$

onde $b^*_i = b_0 + b_i + b_{ii}$ (para $i = 1,2$) e $b^*_{12} = b_{12} - b_{11} - b_{22}$. Tem-se, portanto apenas um coeficiente a mais do que o modelo linear. Para obter um planejamento experimental com um número mínimo de ensaios, é preciso acrescentar, aos dois valores utilizados para determinar o modelo linear, uma outra medida feita numa mistura binária de composição qualquer.

- **Mistura de três componentes**

Pode-se obter modelos de misturas de três componentes (ou misturas ternárias) ampliando os modelos que usamos para misturas binárias. O modelo linear é dado por

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3,$$

com restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$.

Substituindo o termos b_0 por $b_0 (x_1 + x_2 + x_3)$ e agrupando os termos em x_i, obtém-se:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3$$

sendo $b^*_i = b_0 + b_i$, para $i = 1,2$ e 3.

A interpretação dos coeficientes b^*_i é a mesma que no caso de dois componentes. Quando $x_i = 1$ (e, portanto, $x_{j \neq i} = 0$) a resposta y_i será igual ao coeficiente b^*_i. Por exemplo, quando $(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0)$, tem-se $y_1 = b^*_1$. Continua-se podendo determinar os coeficientes do modelo linear sem precisar fazer nenhuma mistura. Da mesma forma, pode-se obter estimativas mais precisas utilizando respostas médias de ensaios repetidos.

Caso o modelo linear não se mostre satisfatório, deve-se tentar ajustar um modelo quadrático, como foi citado. Para misturas de três componentes, a expressão geral do modelo quadrático final contém seis termos:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3 + b^*_{12}x_1x_2 + b^*_{13}x_1x_3 + b^*_{23}x_2x_3$$

onde $b^*_i = b_0 + b_i + b_{ii}$ e $b^*_{ij} = b_{ij} - b_{ii} - bi_j$, com $i \neq j$.

Para determinar seus valores, precisa-se de um planejamento experimental contendo pelo menos seis ensaios distintos.

O modelo quadrático contém, além dos termos do modelo aditivo, termos cruzados que descrevem as interações entre dois componentes, e por isso geralmente consegue-se reproduzir de maneira satisfatória os valores da resposta nos vértices e nas arestas do triângulo de concentrações, que representam respectivamente os componentes puros e suas misturas binárias. Não se deve estranhar, porém, que efeitos não aditivos envolvendo a presença simultânea de três componentes sejam importantes para descrever a resposta de determinadas misturas ternárias (pontos no interior do triângulo). Se esse for o caso, o modelo quadrático se mostrará insuficiente, e precisar-se-á acrescentar-lhe termos cúbicos.

O modelo cúbico especial para uma mistura de três componentes é dado pela equação:

$$\hat{y} = b^*_1x_1 + b^*_2x_2 + b^*_3x_3 + b^*_{12}x_1x_2 + b^*_{13}x_1x_3 + b^*_{23}x_2x_3 + b^*_{123}x_1x_2x_3$$

O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado simplex centroide, que obtém-se acrescentando ao simplex em rede um ponto central que corresponde à mistura ternária em partes iguais, (x_1, x_2, x_3) = (1/3, 1/3, 1/3).

2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A utilização cada vez mais difundida da medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde envolvendo o uso de plantas medicinais, e a consequente maior entrada de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos no mercado brasileiro, tem tornado mais claro, ainda, a necessidade de se buscar parâmetros para o controle de qualidade destes produtos. Um fator limitante para uma maior utilização das plantas é que, a maioria das que estão em uso não possuem parâmetros de qualidade definidos, assim o estabelecimento de métodos analíticos validados, que garantam a quantificação de marcadores químicos para o controle da matéria-prima vegetal e dos produtos em transformação, tanto intermediários quanto finais, é fundamental para a produção de fitoterápicos com qualidade (SCHWANZ, 2006).

A implantação da validação de métodos analíticos de controle de qualidade é justificada por razões legais, técnicas e comerciais. A Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, diz que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO et al., 2003).

Validar um método é um processo demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos. Estabelecer um bom procedimento de validação requer um compromisso entre validar rápido, e com número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas (RIBEIRO et al., 2008).

Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação estão disponíveis atualmente, como: ICH (1996); USP (2005) e ANVISA (2003). No Brasil, os dois orgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

A literatura dispõe de vários trabalhos, que abrangem as áreas biológica, farmacêutica e química, que relatam a validação de métodos analíticos e definem critérios que devem ser seguidos durante o seu desenvolvimento. Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação (BRITO et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é o controle de qualidade de *S. terebinthifolius,* tanto da droga vegetal quanto de extratos obtidos por um modelo matemático denominado simplex centroide e validar a técnica de doseamento de polifenóis do extrato selecionado com os melhores resultados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar macro e microscopicamente a casca da droga vegetal.
- Preparar extratos brutos (EB) de *S. terebinthifolius* Raddi através do modelo matemático simplex centroide de três vértices.
- Pré-validar a metodologia analítica de quantificação de polifenóis totais pelo método da reação de Folin-Ciocalteau.
- Determinar o teor de polifenóis totais da droga vegetal e dos extratos brutos pela metodologia analítica pré-validada através da reação d0e Folin-Ciocalteau.
- Determinar da capacidade antioxidante dos extratos brutos frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).
- Validar a metodologia analítica de doseamento de polifenóis totais do extrato obtido pelo simplex centroide que demonstrar os melhores resultados quanto a rendimento, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes e reagentes

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuem grau de pureza pró-análise (p.a.), e das marcas Synth, Merck®, Sigma®, Dinâmica® ou FMaia®. Foi utilizado álcool etílico de cereais da Cerealcool®.

- Acetona
- Álcool etílico de cereais
- Carbonato de sódio anidro
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
- Metanol – grau HPLC
- Reagente Folin–Ciocalteau 2 mol/L
- Solução metanólica de ButilhidróxiTolueno (BHT)
- Substâncias de referência: pirogalol, ácido gálico, ácido tânico, catequina

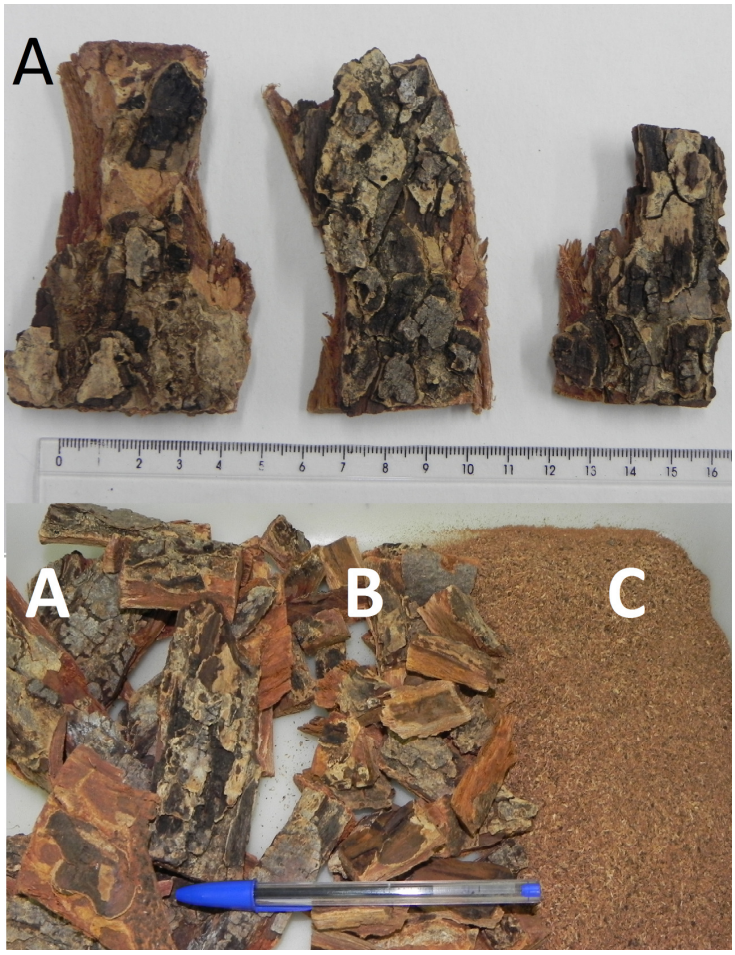
4.1.2 Equipamentos

- Balança analítica Marte®, modelo AY220
- Balança analítica dessecadora com sistema de infravermelho, Ohaus® MB35
- Banho-maria Fanem®, modelo 120/3
- Bomba a vácuo Vaccubrand® Labortechnik tipo MZ 2C
- Espectrofotômetro Shimadzu® UV/VIS PC-1650
- Evaporadores rotatórios Buchi® R-200 e Buchi® R-114
- Liofilizador – Christ® Alpha 1-4
- Mini agitador – LabDancer - IKA®
- Micropipetadores Eppendorf ® (20 a 5000 µL)
- Moinho de martelos Tigres® ASN5
- pHmetro Digimed® mod DM20
- Tamisador vibratório – RETSCH®
- Turboextrator Skymsen®, modelo LS-04
- Ultra-som Elma®, T-460 35 Hz

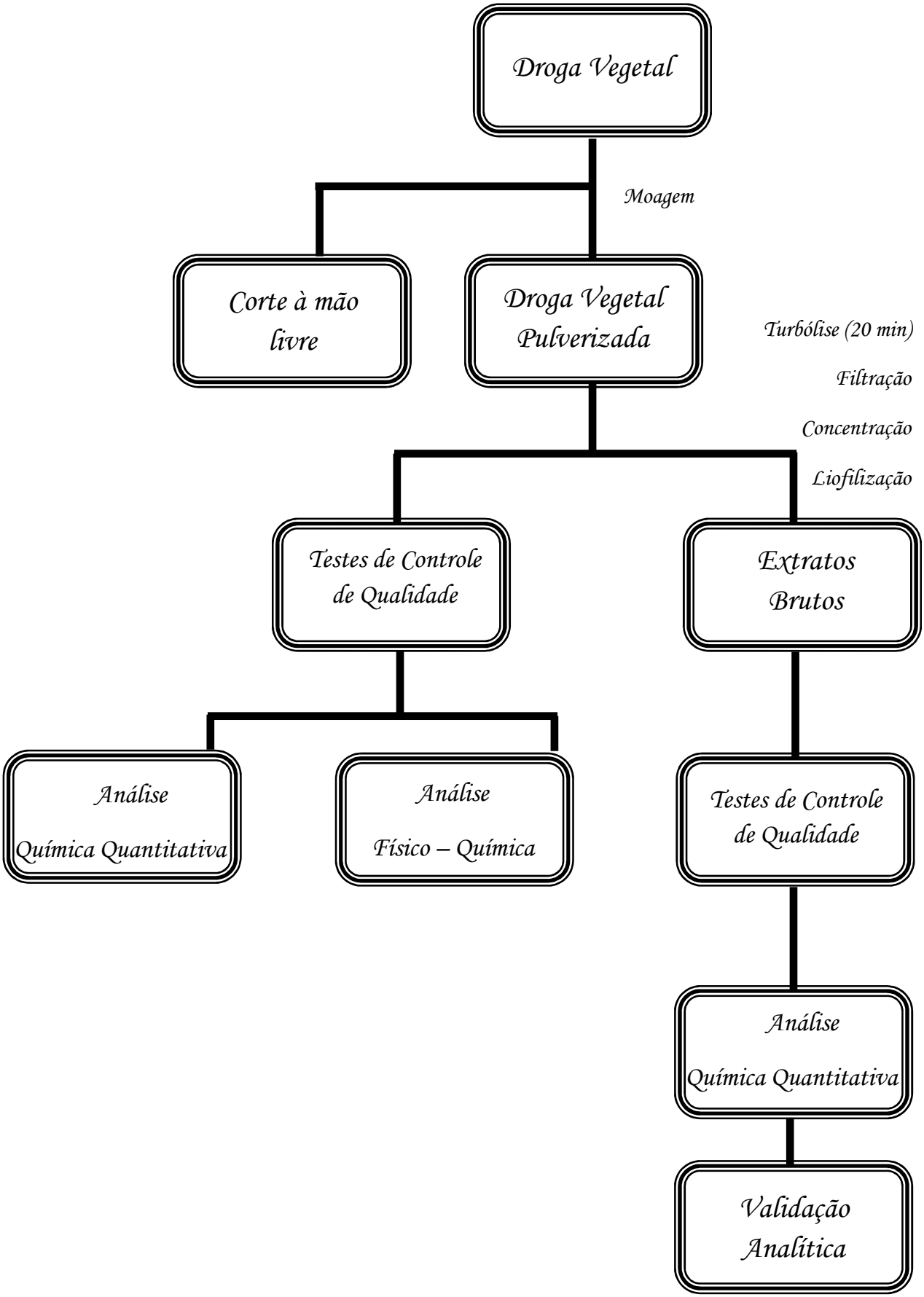
4.2 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A matéria-prima vegetal utilizada nesse trabalho foram as cascas do vegetal *S. terebinthifolius* (Figura 7) as quais foram adquiridas em Caetité, Bahia, Brasil (S14º05'35,2", W42º34'20,2", Garmin, v.2.4), com coleta realizada em junho de 2011. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá, HUEM com número de tombo 22057. As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual após secagem adicional à temperatura ambiente. Após, as cascas (Figura 8) foram cominuídas em moinho de martelos de aço inox Tigre ASN-5 e dessas foram obtidos os extratos. O esquema de trabalho realizado está apresentado no Fluxograma 1.

Figura 8 – Aspectos gerais da casca seca de *S. terebinthifolius*, escala em centímetros, em A: Cascas fragmentadas como recebidas do fornecedor, B) Cascas fragmentadas com auxílio de tesoura de poda, C) Cascas cominuídas pelo moinho de martelos. (Foto: Fernanda Giacomini Bueno, dezembro 2011).



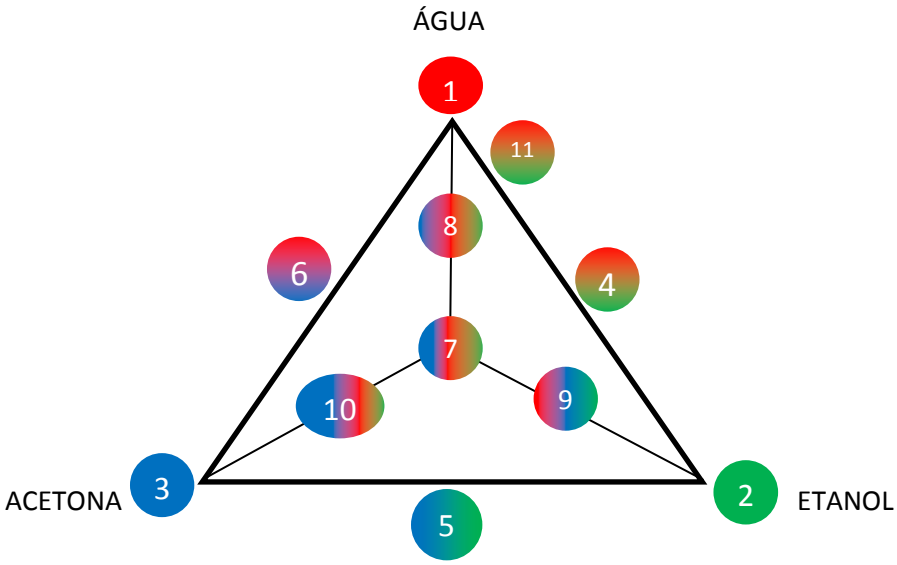
Fluxograma 1 – Rota de trabalho e obtenção dos extratos brutos de *S. terebinthifolius*.



4.3 PREPARO DOS EXTRATOS

Onze extratos foram preparados com a casca cominuída de aroeira (10% m/v) com líquido extrator, em proporções volumétricas: água 100%; etanol 100%; acetona 100%, água:etanol (1:1); etanol:acetona (1:1); acetona:água (1:1); água:etanol:acetona (1:1:1); água:etanol:acetona (4:1:1); água:etanol:acetona (1:4:1); água:etanol:acetona (1:1:4) e água:etanol (8:2) por 20 min em turbólise, como indicado na Figura 9 e na Tabela 1.

Figura 9 - Simplex centroide de 3 vértices, indicado as misturas de líquidos extratores.



Após remoção do solvente orgânico, em evaporador rotatório sob pressão reduzida, os extratos foram liofilizados obtendo-se os extratos brutos (EB 1 a 11).

A partir de cada EB, foi realizado a determinação do teor de polifenóis totais pela técnica pré-validada analiticamente e a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

4.4 PRÉ-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS

A padronização do método foi realizada antes do processo de validação, e foram avaliados quatro parâmetros: 1) tempo de reação, 2) comprimento de onda de absorção máxima, 3) concentração do reagente carbonato de sódio anidro, e 4) o padrão que melhor

se adapta para o extrato bruto (EB) de *S. terebinthifolius.* A metodologia descrita pela Farmacopeia Europeia para a determinação de polifenóis totais (PT) foi utilizada como referência para a diluição do EB e as substâncias de referência (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol).

Tabela 1 - Mistura de líquidos extratores que foram utilizadas para a preparação dos 11 extratos brutos de *S. terebinthifolius.*

Número do Extrato	Liquido Extrator (v/v)
1	Água
2	Etanol
3	Acetona
4	Água : Etanol, 1:1
5	Etanol : Acetona, 1:1
6	Acetona : Água, 1:1
7	Água : Etanol : Acetona, 1:1:1
8	Água : Etanol : Acetona, 4:1:1
9	Água : Etanol : Acetona, 1:4:1
10	Água : Etanol : Acetona, 1:1:4
11	Água : Etanol, 8:2

Solução estoque de cada padrão (25 µg/mL) e EB (180 µg/mL) foi preparada em água destilada. Cento e sessenta microlitros de cada solução foram transferidos para um microtubo de dois mililitros contendo água destilada (800 µL) e Folin-Ciocalteau (80 µL). O volume foi completado a 2 mL com carbonato de sódio anidro 5, 7, 10,75 ou 14,06% (p/p), resultando em concentrações finais de 2 µg/mL para cada substância de referência e 14,4 µg/mL do EB, os volumes do balão de 25 mL e microtubo Eppendorf® de 2 mL são comparados na Tabela 2.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/Vis no tempo de 0 a 40 min após a adição da solução de carbonato de sódio anidro e a amplitude da varredura foi de 400 a 900 nm em intervalos de 1 min entre cada leitura para determinar o espectro. Água destilada foi usada como líquido de compensação.

Para determinar a melhor substância de referência para caracterizar o EB de *S. terebinthifolius*, a absortividade molar de cada padrão e do EB foi calculada pela equação de Lambert–Beer;

Tabela 2 - Comparação volumétrica entre a técnica de polifenóis anterior e a proposta pela pré-validação.

Reagente	Balão de 25 mL	Microtubo 2 mL
Solução do Extrato	2 mL	160 µL
Água	10 mL	800 µL
Folin –Ciocalteau	1 mL	80 µL
Carbonato de Sódio Anidro qsp	25 mL (12 mL)	2 mL (960 µL)

$$A = \varepsilon . b . c$$ Equação (1)

Onde:

A = Absorvância da amostra;

ε = Absortividade molar;

b = caminho ótico, em cm,

c = concentração da amostra em g/100mL

4.5 CONTROLE DE QUALIDADE

As técnicas utilizadas para a avaliação da qualidade da droga vegetal e dos extratos foram realizadas segundo normas farmacopeicas existentes na Farmacopeia Brasileira (2010) e em outras Farmacopeias, assim como outras técnicas não farmacopeicas.

4.5.1 ANÁLISE DA DROGA VEGETAL

4.5.1.1 Corte a mão livre

As cascas foram mantidas em glicerina e FAA (formol, álcool 70% e ácido acético) por 24 h. Os cortes anatômicos foram feitos com lâminas de aço inoxidável. Realizaram-se cortes transversais e longitudinais, utilizando-se pedaços de isopor como suporte. Os cortes foram recolhidos em vidro de relógio contendo água e, após seleção dos melhores, foram colocados em solução de hipoclorito de sódio até total clarificação (OLIVEIRA; AKISUE, 1989). Após, foram novamente lavados em água e foram procedidas as reações com safranina e azul de astra durante dois minutos (GERLACH, 1969).

4.5.1.2Análise granulométrica (HELMAN, 1982)

Foi empregada a técnica de análise granulométrica por tamisação. Foram utilizados tamises com malha de abertura: 1,41; 0,84; 0,25 e 0,177 mm e o coletor. Pesaram-se 100,00 g do vegetal moído que foram colocados no conjunto de tamises. O conjunto foi tamisado durante 15 min a 70 vibrações por minuto. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada tamis. O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se abertura da malha (mm); Δ abertura de malha (mm); abertura média ($\overline{m}$, mm); massa retida (%); fração retida (R, %) e fração passagem (%). Esses dados possibilitaram o cálculo do diâmetro médio de partícula (d_{50}) pelo ponto de cruzamento das curvas de passagem e retenção. Além disso, esse resultado foi comparado ao diâmetro médio calculado pela equação (ANSEL et al., 2005):

$$d_{50} = \frac{\overline{m}.\sum R(\%)}{100}$$

4.5.1.3 Determinação da perda por dessecação (CARDOSO, 2002)

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Cerca de 1 g da droga vegetal moída foi exatamente pesado em bandejas de alumínio taradas, e dessecada por 15 min à temperatura de 105 °C, com intervalo de 15 min entre cada determinação, tempo necessário para o resfriamento da balança. O resultado foi calculado em relação a 100 g da droga, pela média de três determinações.

4.5.1.4Determinação do teor de polifenóis totais

Foram pesados cerca de 0,075 g de droga pulverizada, transferida para um erlenmeyer com 15 mL de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 85 °C. Após resfriamento em água corrente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água. Cerca de 5 mL do extrato foram filtrados. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM). Para a determinação de polifenóis totais (PT), 160 µL da SM foram adicionados a água (800 µL) em tubo microtubo de 2 mL com 80 µL de solução de ácido fosfotúngstico R 2 mol/L (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteau) e 960 µL da solução de carbonato de sódio definido na pré-validação. O

tempo de leitura e comprimento de onda foram definidos na pré-validação, empregando-se a água como branco. Foram realizados três testes, cada um com n=6.

$$\%\mathrm{PT} = \frac{mP.AbsA.FDA}{AbsP.mA.FDP}.100 \qquad \text{Equação (2)}$$

Onde:
mP: massa do padrão
AbsA: absorvância da amostra
FDA: fator de diluição da amostra
AbsP: absorvância do padrão
mP: massa da amostra
FDP: fator de diluição do padrão

4.5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS

4.5.2.1 Determinação do teor de resíduo seco

Para a determinação do resíduo seco foram preparadas 11 soluções extrativas com diferentes solventes, sendo as mesmas dos extratos preparados. Uma amostra de 10,0 g de cada solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporado até secura em chapa de aquecimento. O pesa-filtro foi colocado em estufa até peso constante à temperatura de aproximadamente 105 ºC, resfriado em dessecador. A média foi calculada pela análise de quatro determinações.

4.5.2.2 Determinação do teor de polifenóis totais

Foi pesada quantidade cerca de 0,0045 g do extrato que foi diluída em balão volumétrico de 25 mL (SM), 160 µL desta solução foram adicionados em água (800 µL) em microtubo de 2 mL com 80 µL de solução de ácido fosfotúngstico R 2 mol/L (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteau) e 960 µL da solução de carbonato de sódio com concentração definidas na pré-validação, assim como o tempo de leitura e comprimento de onda, empregando-se a água como branco. Foram realizados três testes, cada um com n=6 e o teor de polifenóis totais foi calculado pela Equação 2 (item 4.5.1).

4.5.2.3 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Extratos foram diluídos em 3 mL de metanol, de modo a atingir concentrações de 0,5 a 8,0 µg/mL. A estas soluções acrescentaram 375 µL de solução de DPPH (1 mmol/L). A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas a 517 nm, em espectrofotômetro. Foi utilizado como branco uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 mL de metanol) adicionada de 500 µL de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 mL de metanol e 375 µL de solução de DPPH. A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoramento do DPPH, usando a Equação 3. (AMAROWICZ et al., 2004).

$$\%\text{ASR} = \frac{AbsCN - AbsA}{AbsCN}.100 \qquad \text{Equação (3)}$$

Onde:
AbsCN = Absorvância do controle negativo
AbsA = Absorvância da amostra

4.6 VALIDAÇÃO DA METOLOGIA ANALÍTICA

O extrato que foi escolhido para ser submetido à validação da metodologia analítica foi aquele que apresentou os melhores resultados para as respostas (parâmetros) escolhidas: rendimento; pois é necessário que se obtenha um extrato com boa quantidade em massa, polifenóis totais; já que são esses compostos os de maior parte no extrato de aroeira, conhecidos na literatura e os quais são responsáveis pelas atividades biológicas características e finalmente a atividade antioxidante, pois ela sugere quanto que o extrato atuará frente a radicais livres.

A RE 899/2003 (ANVISA) foi seguido como guia para a validação da metodologia analítica de doseamento de polifenóis totais.

4.6.1 Curva de calibração da substância de referência

Para a determinação das absorvâncias teóricas do teste de exatidão e a absorvância específica da substância, foi construída a curva de calibração com 6 pontos pela análise de concentração 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 µg/mL da substância de referência, utilizando como solução-mãe padrão de concentração 25 µg/mL. Considerou-se o critério mínimo aceitável do

coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior que 0,99 e os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

4.6.2 Linearidade

Para esta análise foram utilizadas amostras de concentrações crescentes, em triplicata, do EB de *S. terebinthifolius* 4,95; 7,47; 10,98; 14,4 e 17,28 µg/mL, que foram escolhidas pela respectivas absorvâncias que se encontraram entre 0,200 e 0,800 para que se fosse garantida a segurança da análise pelo aparelho espectrofotômetro. Foi realizada a análise da equação da reta e considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior que 0,99, para que o método apresente linearidade. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

4.6.3 Especificidade

A especificidade do método foi testada pelo acréscimo de 40 µL de uma solução 25 µg/mL do padrão pirogalol às cinco diferentes concentrações da linearidade, em triplicata, resultando em concentração final de pirogalol em 0,5 µg/mL em todas as amostras analisadas. A curva gerada foi analisada e comparada com a curva obtida pelo teste de linearidade do EB de *S. terebinthifolius*. O critério de aceitação para um método especifico é a obtenção de curvas paralelas e com o mesmo coeficiente angular.

4.6.4 Seletividade

A seletividade do método foi testada pela adição de 40 µL de uma solução do padrão cafeína (25 µg/mL), a qual é a substância de referência para metilxantinas, na amostra de concentração 10,98 µg/mL de EB de *S. terebinthifolius,* em triplicata, resultando na concentração final de cafeína de 0,5 µg/mL. O método é considerado seletivo para polifenóis totais quando não há aumento significativo da absorvância.

4.6.5 Limite de detecção

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da menor concentração da faixa da linearidade (4,95 µg/mL) até a menor concentração detectável do

analito. O resultado foi comparado ao limite de quantificação determinada pela curva de linearidade do EB de *S. terebinthifolius* pela equação 4:

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{IC} \qquad \text{Equação (4)}$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y; IC = inclinação da curva

4.6.6 Limite de quantificação

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da amostra menos e mais concentrada da curva de linearidade do EB de *S. terebinthifolius*. Foi determinada a menor e a maior amostra que manteve a linearidade da curva dentro do critério de aceitação de linearidade, coeficiente de correlação (R^2) igual ou superior a 0,99. O limite de quantificação inferior foi comparado ao resultado determinado pela curva de linearidade do EB de *S. terebinthifolius* pela equação 5:

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \qquad \text{Equação (5)}$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y; IC = inclinação da curva

4.6.7 Intervalo

O intervalo de quantificação foi estipulado pelos limites de quantificação inferior e superior, no qual é possível analisar amostras e obter linearidade, exatidão e precisão.

4.6.8 Precisão

Foram avaliadas a precisão intra-corrida (repetibilidade) e a precisão inter-corrida (intermediária). A repetibilidade foi analisada por 6 determinações da concentração teórica do teste (10,98 µg/mL) do EB de *S. terebinthifolius.* Para a precisão intermediária foi analisada, em triplicata, em dias diferentes (pelo menos 2 dias de intervalo), não sendo admitido coeficiente de variação superior a 5%.

4.6.9 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela porcentagem de recuperação, considerando a adição de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL (concentrações baixa, média e alta, respectivamente) de soluções de pirogalol (25 µg/mL), em triplicata, à 10,98 µg/mL do EB de *S. terebinthifolius*. A porcentagem de recuperação foi calculada pela equação 6:

$$R(\%) = \frac{A.100}{A_T}$$ Equação (6)

Em que:
R(%) = porcentagem de recuperação;
A = absorvância obtida nas amostras;
A_T = absorvância teórica das amostras

A absorvância teórica foi calculada pela soma da absorvância da concentração 10,98 µg/mL de EB de *S. terebinthifolius* obtida no teste de linearidade e da absorvância esperada pelo pirogalol determinada pela equação da reta da curva de calibração para cada nível (baixo, médio e alto).

4.6.10 Robustez

Para se determinar a robustez do método foi avaliada a estabilidade da solução mãe do extrato bruto de *S. terebinthifolius*, à luz natural por 90 min, assim como toda a preparação para a realização do teste foi mantida sem proteção da luz. As amostras foram preparadas, em triplicata, e os resultados comparados com a absorvância obtida, por essa amostra, no teste de linearidade.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS

As análises estatísticas dos dados foram efetuadas usando o programa Statistica® 8.0 (StatSoft Copyright, Inc.). Os resultados foram expressos em média ± DP [CV%] e foram analisadas usando o teste ANOVA ou Tukey. As diferenças significativas foram determinadas através do teste de Tukey em comparação com o grupo controle, considerando $P<0,05$ como critério de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia foi submetida a uma etapa de pré-validação, na qual se avaliou: 1) a cinética de reação; 2) comprimento de onda de absorção máxima; 3) concentração do reagente carbonato de sódio anidro (5; 7, 10,75 e 14,06%) e 4) substância de referência que melhor caracteriza o EB etanol: água (8:2) de S*. terebinthifolius*.

Quanto à cinética de reação, o tempo de estabilidade da reação e o pico de absorção máxima foram comparados. Quatro concentrações do reagente carbonato de sódio anidro (5; 7; 10,75 e 14,06%) foram adicionados por último à solução contendo o extrato diluído em água e o reagente de Folin-Ciocalteau. A varredura foi realizada pelo aparelho espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados estão apresentados no Anexo 3 e Figura 10.

O carbonato de sódio anidro é um sal que em água torna o meio alcalino logo ocorre a redução dos polifenóis formando o óxido azul de tungstênio. Portanto a intensidade da coloração azul é proporcional à quantidade de polifenóis presentes na solução.

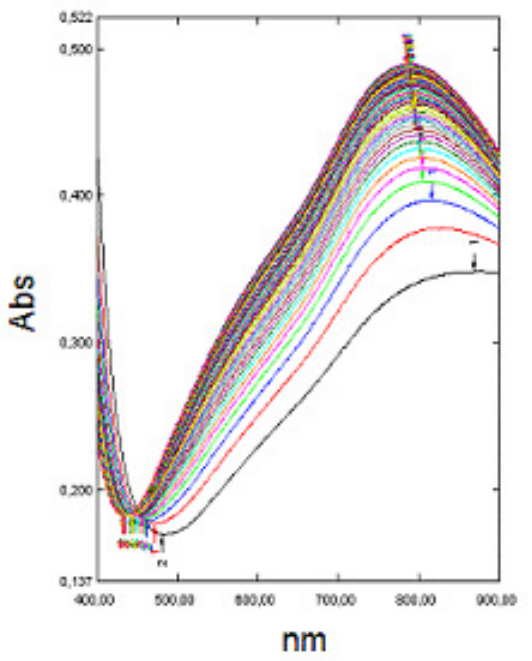
Analisando os dados pelo teste ANOVA de um fator, pode-se observar grandes diferenças quanto ao tempo de estabilização da reação para doseamento de PT. Na concentração do reagente carbonato de sódio anidro a 5% a reação foi estável a partir de 25 min, já para 7% a reação mostrou estabilidade em 15 min, no entanto, na concentração de 10,75% em 10 min a reação já estabilizou-se e, mostrando como melhor resultado, a concentração 14,06% foi estável em apenas 5 min após a adição do reagente alcalinizante.

Logo a maior concentração estudada da solução de carbonato de sódio anidro de 14,06% foi escolhida por fornecer o pico de reação para PT no EB de *S. terebinthifolius* em menor tempo, otimizando a reação de doseamento, além de promover uma maior absorvância nessa reação (Tabela 3).

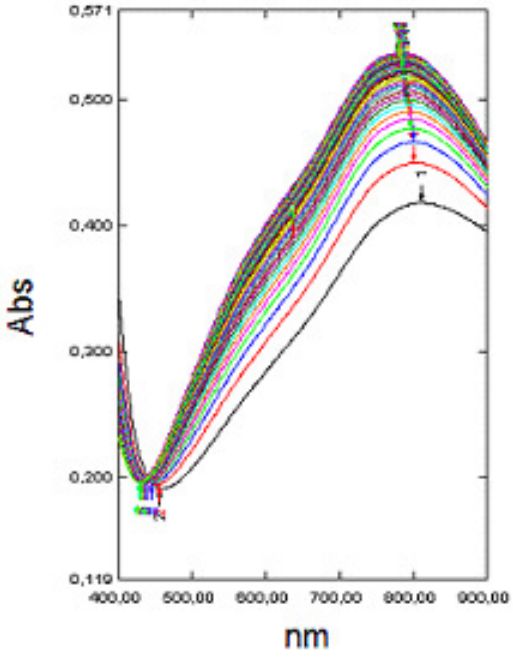
O espectrofotômetro forneceu também o comprimento de onda em que ocorria o pico de absorção para o doseamento, dados também constantes no Anexo 3 e na Figura 10.

Pode-se observar nitidamente pelos resultados que o comprimento de onda do pico absorção máxima está próximo a 780 nm, sendo bem distante daqueles anteriormente citados em literaturas como 691,715 e 760 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007; GLASL,1983).

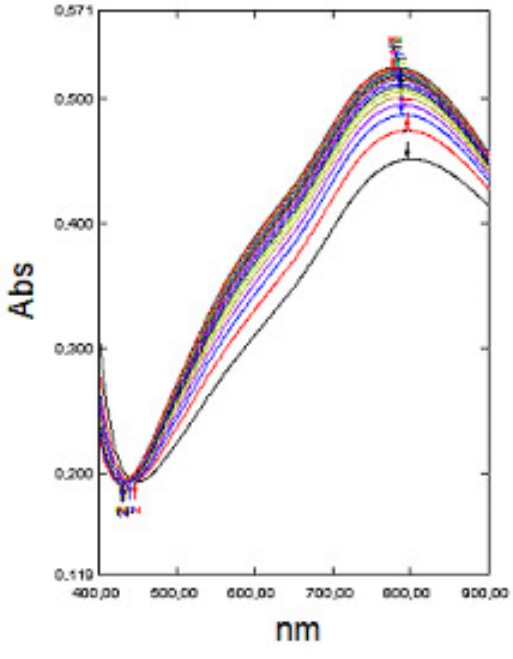
Figura 10 - Varredura de 900 a 400 nm para o EB nas diferentes concentrações de carbonato de sódio.



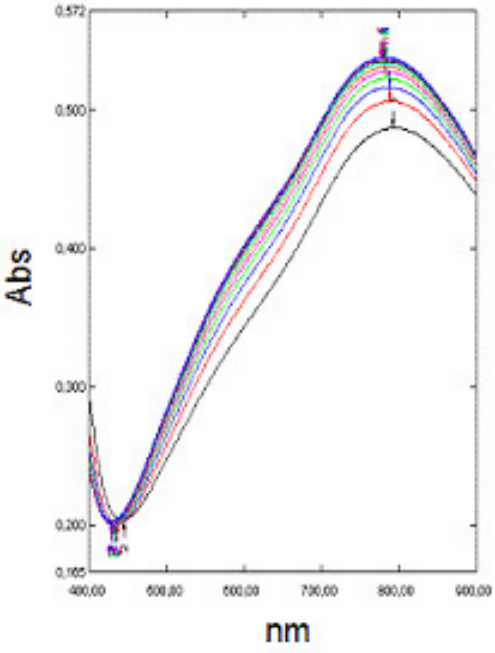
Varredura Carbonato 5%



Varredura Carbonato 7%



Varredura Carbonato 10,75%



Varredura Carbonato **14,06%**

Tabela 3 – Diferentes concentrações do reagente carbonato de sódio quanto ao tempo de estabilização e absorvância média.

Concentração do Reagente Carbonato de Sódio Anidro (%)	Tempo de estabilização (min)	Absorvância média no tempo estável (n=3) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
5	25	0,472 ± 0,008 (1,72)
7	15	0,511 ± 0,014 (2,74)
10,75	10	0,519 ± 0,008 (1,53)
14,06	5	0,542 ± 0,015 (2,94)

$\bar{x}$ = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Logo, para que haja a melhor quantificação da reação, foi proposto para o doseamento de PT para o EB de *S. terebinthifolius* o comprimento de onda que deve ser utilizado é de 780 nm.

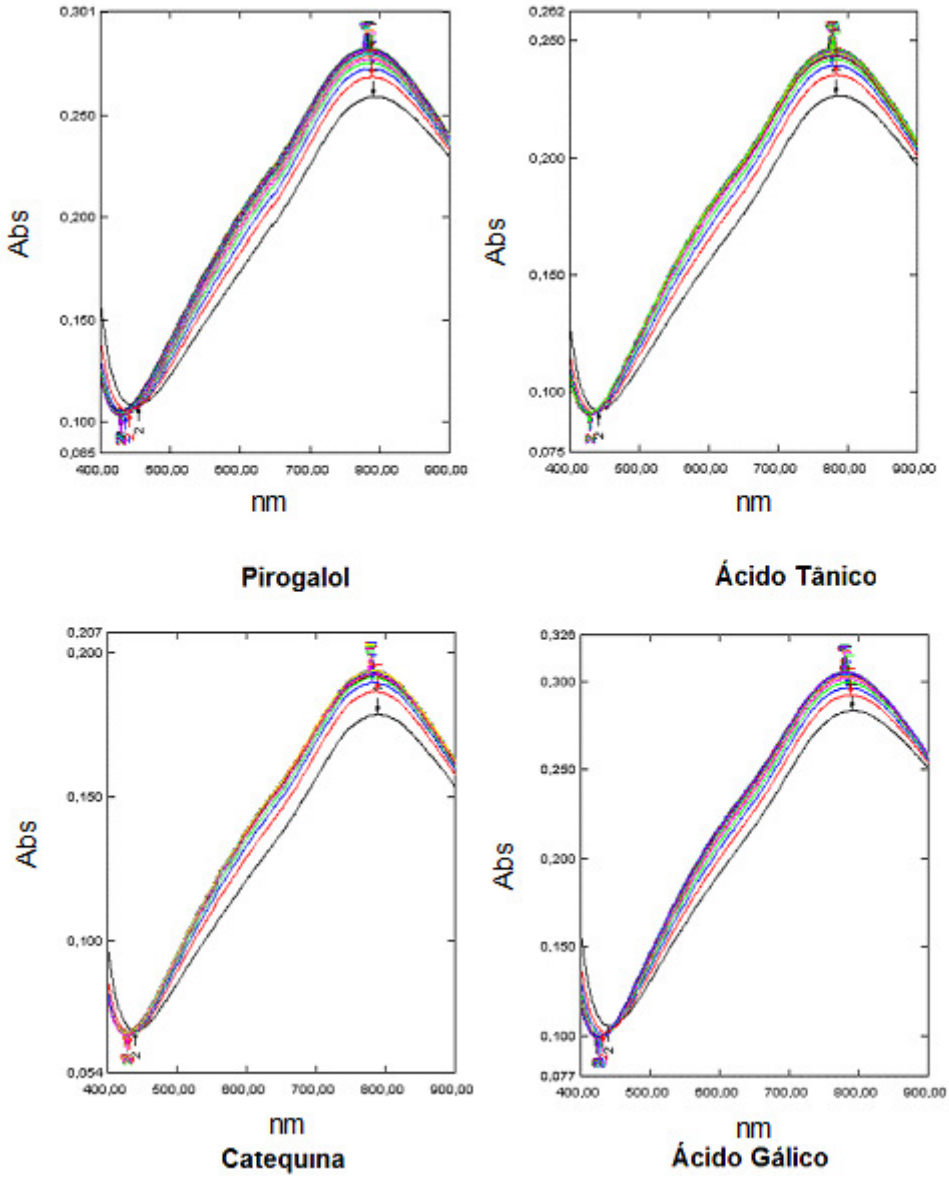
Para verificar qual substância padrão se melhor adequou ao EB de *S. terebinthifolius* foi realizada a varredura de 0 a 40 min, de 1 em 1 min, entre 900 e 400 nm, na concentração do reagente carbonato de sódio anidro de 14,06% pois como foi demonstrado anteriormente esta concentração promove uma estabilização da reação mais rápida, com os padrões pirogalol, ácido tânico, catequina e ácido gálico. Os dados estão no Anexo 4 e na Figura 11.

Observa-se pelas figuras que o comprimento de onda do pico de absorção máxima para as substâncias de referência também está próximo de 780 nm.

Analisando os dados da absorvância contidas no Anexo 4, lidas a 780 nm, pelo teste ANOVA de um fator, foi observado que para as substâncias de referência pirogalol e ácido gálico a reação de doseamento de PT foi estável já em 0 min após a adição de carbonato de sódio anidro, já para os outros dois, catequina e ácido tânico, a reação foi estável em 1 min após de adição do carbonato de sódio anidro 14,06%.

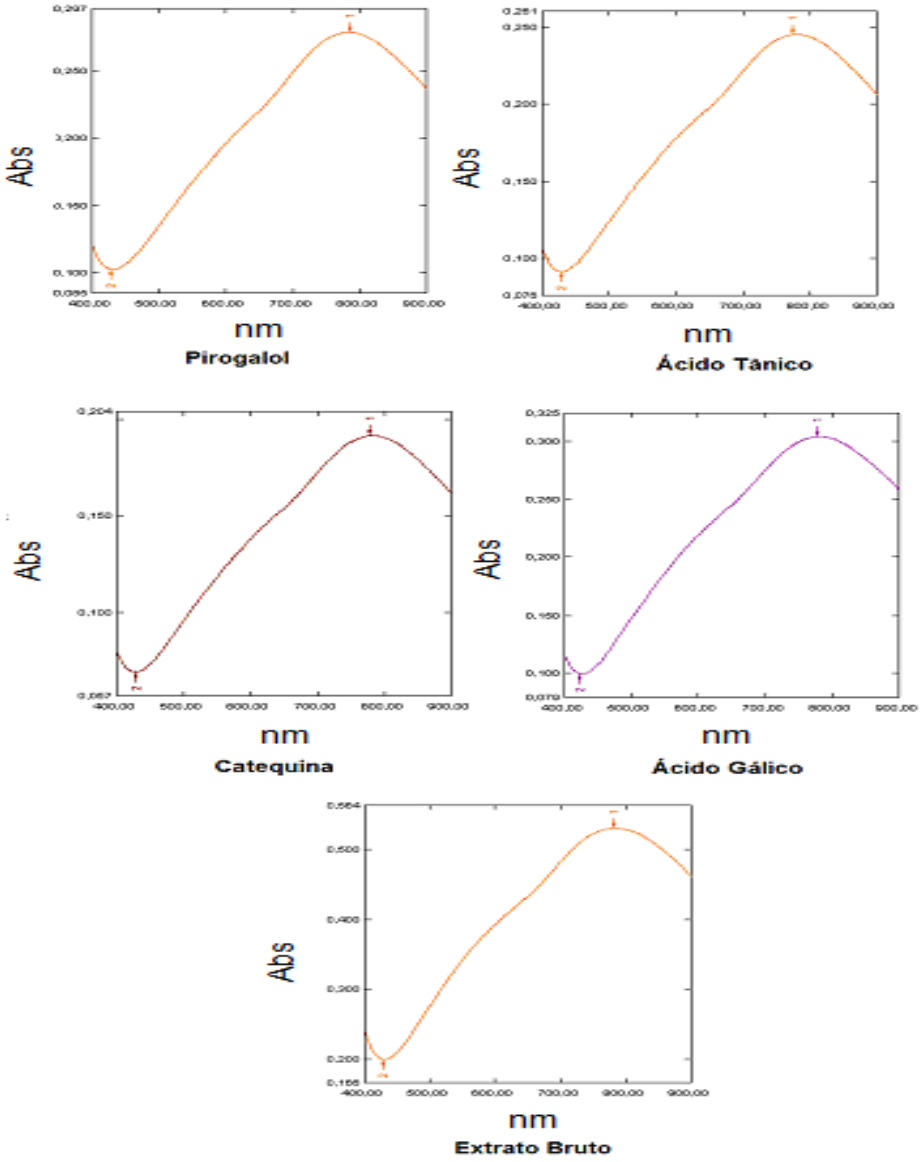
Assim, conclui-se pelos dados da Figura 11 que a reação de redução do ácido fosfotúngstico é estável, sendo que o aumento na absorvância a 5 min não ultrapassa 5% em relação à absorvância a 0 ou 1 min. Além disso, não há decréscimo na absorvância a partir dos 5 min. Assim, opta-se pela mudança da leitura de 30 min, como preconizado inicialmente pela metodologia, utilizando-se então 5 min, para que o EB de *S. terebinthifolius* e o padrão sejam lidos no mesmo tempo.

Figura 11 - Varredura de 900 a 400 nm para as substâncias de referência pirogalol, ácido tânico, catequina e ácido gálico, na concentração 14,06% de carbonato de sódio anidro.



Como foi postulado que para o EB de *S. terebinthifolius* a leitura seria em 5 min após a adição do reagente carbonato de sódio anidro a 14,06%, a varredura no tempo de 5 min de cada padrão foi comparada com a mesma do EB de *S. terebinthifolius (*Figura 12).

Figura 12 - Varredura de 900 a 400 nm para os padrões e EB no tempo de 5 min na solução carbonato de sódio anidro 14,06%.



A cinética de reação do reagente Folin-Ciocalteau com pirogalol e EB de *S. terebinthifolius* mostrou comportamento semelhante (Figura 12). Além disso, as substâncias analisadas apresentam diferentes absortividades específicas (Tabela 4) o que demonstra que diferentes polifenóis podem alterar diferentemente a cor, da solução reacional, por unidade de massa e, levar à determinação de teor de polifenóis totais que não refletem a quantidade real.

Considerando a estrutura molecular das substâncias de referências em estudo (Figura 13), observa-se que o pirogalol é o que apresenta maior número de hidroxilas proporcional à massa molar. Além disso, o pirogalol constitui-se por apenas um anel aromático e ausência de grupamentos substituídos, o que proporciona uma estrutura

tridimensional com hidroxilas com menor influência por interações eletrônicas, como impedimento estérico ou efeito ressonância, que diminuiriam a disponibilidade dessas hidroxilas em promover a redução de outros compostos. Dessa forma, o pirogalol apresenta maior absortividade específica (Tabela 4) e, provavelmente, seja a melhor substância de referência na determinação de polifenóis totais por, indiretamente, representar o potencial reducional do EB de *S. terebinthifolius* considerando a disponibilidade total das hidroxilas ligadas ao anel aromático. Os fatores da técnica para a determinação dos PT foram comparados na Tabela 5.

Tabela 4: Absortividade específicas das substâncias de referência e teor de polifenóis totais aproximado no EB de *S. terebinthifolius* expressos em cada substância à 780 nm e 5 min pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteau.

Substância de Referência	**Absortividade Molar**	**PT em EB de *S. terebinthifolius* (%)**
Ácido gálico	1445	26,76%
Ácido tânico	1195	32,36%
Catequina	965	40,08%
Pirogalol	1505	25,70%

Figura 13 - Estrutura química das substâncias de referências: (A) ácido gálico ($C_7H_6O_5$), (B) ácido tânico ($C_{76}H_{52}O_{46}$), (C) catequina ($C_{15}H_{14}O_{6)}$ e (D) pirogalol ($C_6H_6O_3$).

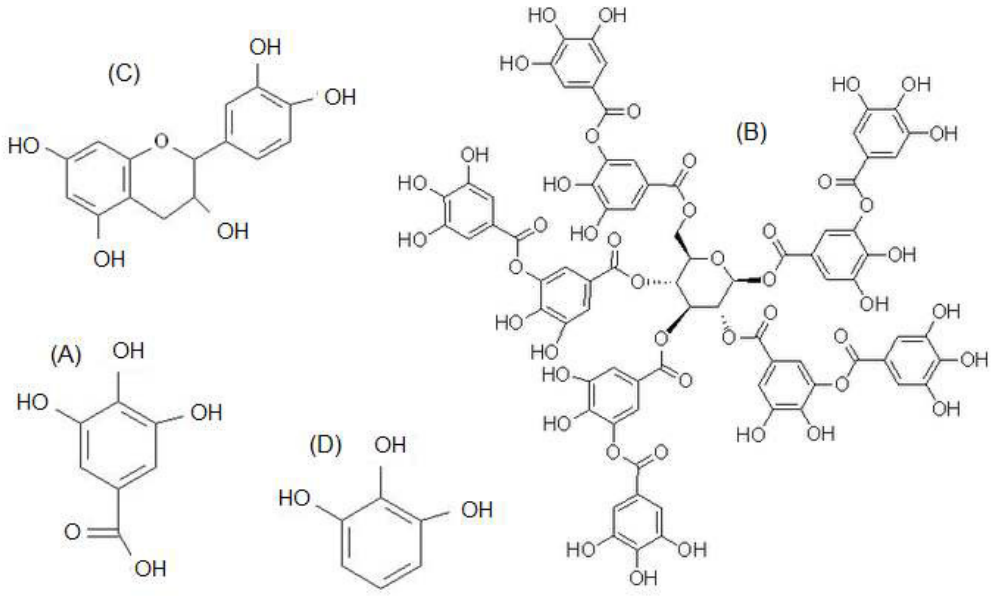


Tabela 5 - Fatores da técnica de doseamento de PT comparados entre a pré-validação para o EB de *S.terebinthifolius* e as outras metodologias encontradas na literatura.

Fator	EB *S. terebinthifolius*	Metodologia GLASL*	Metodologia Farmacopeia Europeia**
Concentração Carbonato de Sódio Anidro (%)	14,06	14,06	10,75
Comprimento de Onda (nm)	780	691	760
Tempo de Leitura (min)	5	15	30

*GLASL (1983)

**EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2007)

Devido à grande diversidade entre as metodologias optou-se por realizar a validação da metodologia analítica de determinação de polifenóis totais (PT) e assim garantir confiabilidade nos resultados apresentados. A determinação de taninos totais a partir da complexação com pó-de-pele não foi realizada por apresentar um alto desvio padrão e, portanto, não apresentar reprodutibilidade e assim denotar falta de confiança nos resultados.

Bueno et al. (2012) pré-validaram a técnica de doseamento de PT para o extrato hidro-alcoólico de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. e obtiveram como resultado: pirogalol como substância de referência, reagente carbonato de sódio anidro na concentração de 10,75%, 10 min e 760 nm como comprimento de onda para a leitura.

5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Nesse trabalho foram escolhidos os solventes água, etanol e acetona para a extração da droga vegetal por já serem utilizados na prática como extratores de polifenóis, pois apresentarem polaridade compatível com as substâncias de interesse, boa disponibilidade e baixo custo.

O método extrativo de escolha foi a turbo-extração, o qual se baseia na extração concomitante com a redução do tamanho de partículas, resultado da aplicação da força de cisalhamento, com rápida dissolução das substâncias no líquido extrator.

O tempo necessário para se realizar a extração foi de 20 min, sendo que a cada 5 min de agitação foram seguidos de 5 min de repouso para que a temperatura do solvente não ultrapassasse 40 °C. Esse cuidado foi tomado para que não houvesse degradação de

alguma substância e não houvesse grandes perdas do solvente por volatilização. Após extração, os extratos foram filtrados em tela de nylon e algodão sobre pressão negativa, concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizados.

Após a determinação da massa obtida de extrato bruto seco o rendimento foi calculado. Os dados estão mostrados na Tabela 6 e a superfície de resposta e as curvas de nível do simplex centroide dos extratos produzidos para o rendimento está representada na Figura 14 a e b, respectivamente. No modelo quadrático, pois esse mostrou-se significativo em todas as interações (Pvalor<0,05) no teste análise de variância realizada pelo programa Statistica®. Por não haver replicatas do teste o modelo não pode ser usado para previsão.

Para verificar a variabilidade na produção, o extrato número 4, selecionado aleatoriamente, foi produzido mais duas vezes, obtendo três amostras do extrato 4 (4, 4' e 4''). O teor de resíduo seco destes três extratos mostrou um coeficiente de variação menor do que 5% (valores não mostrados) e Pvalor menor do que 0,05. Sendo assim, a produção de uma amostra de cada extrato foi considerada adequada para as análises posteriores.

Tabela 6 - Resultados, em porcentagem, do rendimento dos extratos secos em diferentes soluções extrativas das cascas de *S. terebinthifolius*.

Extrato	Solvente (v/v)	Rendimento (%)
1	Água	16,86
2	Etanol	15,86
3	Acetona	9,93
4	Água : Etanol (1:1)	23,71
5	Etanol : Acetona (1:1)	18,45
6	Água : Acetona (1:1)	18,60
7	Água : Etanol : Acetona (1:1:1)	22,72
8	Água : Etanol : Acetona (4:1:1)	25,79
9	Água : Etanol : Acetona (1:4:1)	19,33
10	Água : Etanol : Acetona (1:1:4)	18,41
11	Água : Etanol (8:2)	22,11

Figura 14 a - Superfície de resposta para a variável rendimento na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*, modelo quadrático.

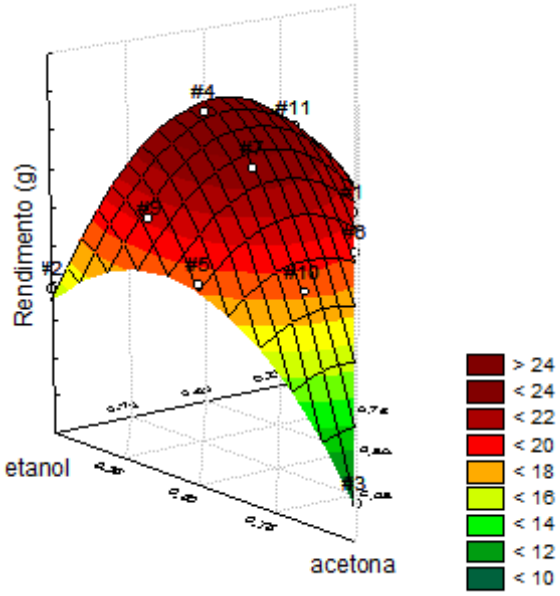
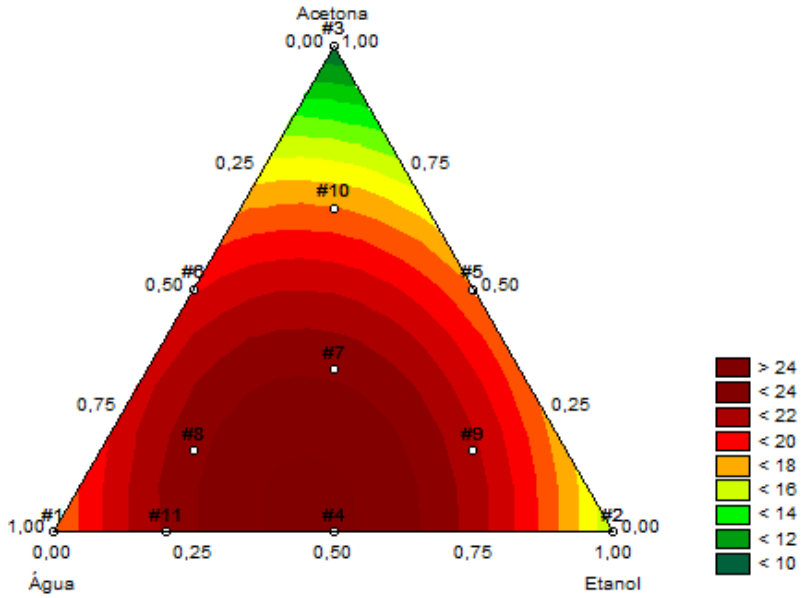


Figura 14 b - Curvas de nível para a variável rendimento na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius*. Com equação representativa: r = 17,71 h + 15,08 e+9,89 c + 31,10 he + 24,18 hc + 22,20 ec, onde r: rendimento, h: água, e: etanol e c: acetona, modelo quadrático.



Pode-se observar que a região vermelha escuro, entre número 7, 4, 8 e 9 é aquela que demonstra a melhor resposta quanto ao rendimento para os extratos observados.

Antes de executar a extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia.

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. Devido à seletividade é que se pode extrair apenas substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, e de acordo com o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair, determina-se o solvente ou mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Costuma-se utilizar etanol, metanol, água, acetona e suas misturas para a extração de polifenóis em geral, bem como na área farmacêutica a preferência recai sobre a água e misturas desta com álcool etílico.

Na escolha de um solvente devem ser considerados a toxicidade e os riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente.

5.3 CONTROLE DE QUALIDADE

Para a *S. terebinthifolius*, cuja monografia não consta na versão atualizada da Farmacopeia brasileira fez-se necessário a elaboração de parâmetros de qualidade atualizados.

No caso de plantas medicinais brasileiras, a grande maioria delas encontra-se descrita apenas na primeira edição da Farmacopeia brasileira, editada em 1929, parte das mesmas, inclusive a *S. terebinthifolius*, foi suprimida na segunda edição.

Para realizar o controle de qualidade de *S. terebinthifolius*, foram utilizadas cascas de um lote já denominado anteriormente. A realização de vários ensaios farmacopeicos e não farmacopeicos foram necessários para atingir o objetivo citado anteriormente.

Para o controle de qualidade de uma matéria-prima vegetal, diversos métodos químicos, físicos e físico-químicos tais como cromatografia em camada delgada, determinação da perda por dessecação e do teor de extrativos, quantificação do teor de substâncias ativas são utilizadas a fim de caracterizar e padronizar o material vegetal ou mesmo seus derivados extrativos.

Considera-se a fitoterapia como uma medicina alternativa, porém, a fitoterapia trata-se de uma alternativa terapêutica e, assim, necessita de toda padronização necessária para assegurar a produção adequada do fitomedicamento de forma a atingir os resultados terapêuticos esperados.

Para a obtenção de fitomedicamentos com qualidade, eficazes e seguros, além da pesquisa farmacológica, é necessário um longo processo de desenvolvimento com qualidade, que se inicia muito antes da entrega da matéria-prima à indústria. Para isso é

necessário um adequado processo de cultivo, estabilização e processamento dessa matéria-prima.

As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos, na pureza e mesmo nas características fenotípicas ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionadas com a atividade farmacológica.

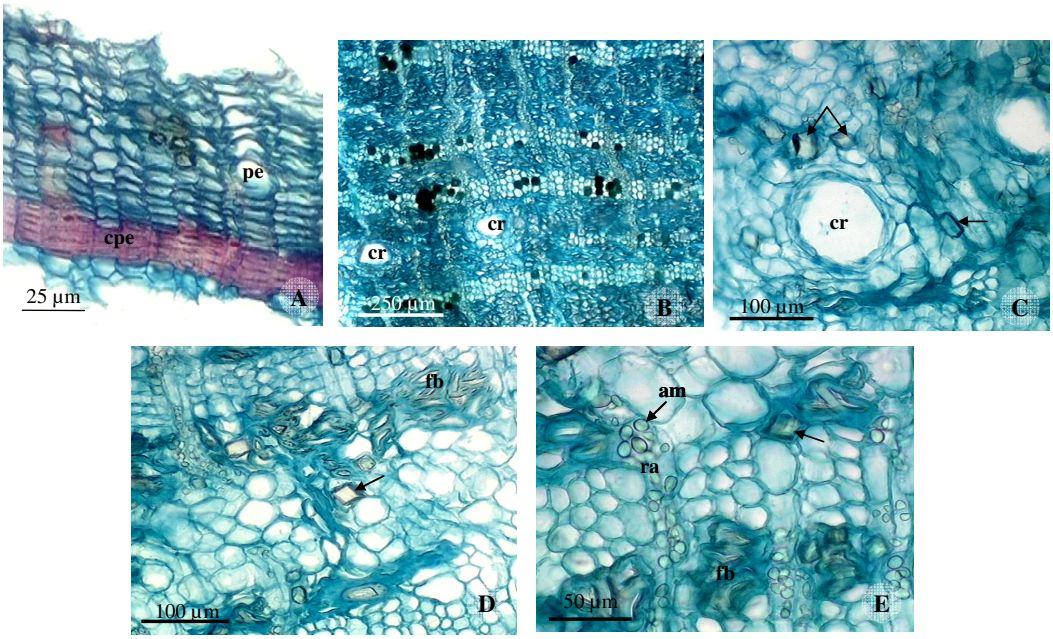
No desenvolvimento de um fitomedicamento, somente um processo eficaz de produção e de controle de qualidade, aliado aos estudos farmacológicos, pode garantir um adequado emprego terapêutico. Com isso, a padronização química e o conhecimento da constituição do fitocomplexo são importantes para diferenciar a ação farmacológica da potencial toxicidade.

5.3.1 Análise da droga vegetal

5.3.1.1 Corte a mão livre

Pode-se observar pelas Figuras 8 e 15 que as características macro e microscópicas estão de acordo com as descritas na monografia da Farmacopeia Brasileira 1ª edição (FARMACOPEIA, 1929). A casca apresenta-se com espessura variável. Sua superfície externa é de cor pardo-acinzentada, profundamente fendida no sentido longitudinal e um tanto no sentido transversal. É muito rugosa, a face interna é estriada longitudinalmente e de cor pardo-avermelhada, é impregnada de matéria resinosa, que aparece em sua superfície sob a forma de lágrimas de tamanho variável. A camada liberiana é bastante espessa e caracterizada pela presença de canais secretores, de fibras e de floema, que em seu conjunto, são dispostos em série, bastante regularmente paralelos, que se alternam com faixas mais ou menos largas de um parênquima liberiano com cristais prismáticos de oxalato de cálcio presentes; os canais secretores são bastante largos, arredondados, as fibras são grandes, de paredes espessas e reunidas em grupos mais ou menos volumosos. Esta casca é atravessada em quase toda sua espessura por estreitos raios medulares, formados de uma ou três fileiras alongadas nos sentido radial, contendo grãos de amido de tamanhos diversos.

Figura 15 -Secções transversais da casca caulinar de *S. terebinthifolius.* Em A: detalhe da espessa periderme com camadas de células de parede espessada (pe) em sua base; B: aspecto geral do tecido cortical; C, D e E: detalhes de um canal resinífero (cr), do tecido parenquimático com fibras obliteradas (fb), e de um raio parenquimático (ra) contendo grãos de amido (am), respectivamente. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio.



5.3.1.2 Análise granulométrica

O tipo de moinho utilizado foi o de martelos, o qual tem por princípio a concussão em sistema contínuo. Esse é apropriado para a moagem grosseira de folhas, raízes e cascas pois, materiais friáveis e quebradiços produzem nesse moinho pó fino em excesso. Neste sentido, foi tomado o cuidado em utilizar um modelo de moinho que possui seu motor blindado, ou seja, o óleo do motor não vaza, assim não entra em contato com o material que está sendo moído, evitando a contaminação da droga vegetal.

Os componentes do moinho são de material apropriado para não enferrujar, sendo este material aço inoxidável AISI – 316 L. O martelo do moinho é fabricado com um material específico para ferramentas, sendo este chamado de aço duro, descartando a possibilidade da quebra de partes do martelo e a contaminação da droga vegetal por partes do moinho.

A Figura 16, gráfico de distribuição granulométrica da droga rasurada, mostra que a maior porcentagem de partículas encontra-se numa faixa granulométrica que varia de 0,84 a 0,25 mm.

A distribuição granulométrica obtida na técnica por tamisação está descrita na Tabela 7 e representada na Figura 16. O diâmetro médio (d_{50}) das partículas, determinado pelo ponto de intersecção das curvas de passagem e retenção (Figura 17), é de 0,44 mm,

enquanto o valor determinado pela equação proposta por Ansel et al. (2005), é de 0,32 mm. Esses valores apresentam diferença considerável, assim outros métodos de determinação do d_{50}, como métodos microscópicos, devem ser realizados, a fim de determinar com exatidão o d_{50} das partículas.

Tabela 7 - Análise granulométrica por tamisação das cascas de *S. terebinthifolius.*

Abertura da malha (mm)	Δ Abertura da malha (mm)	Abertura média ($\overline{m}$,mm)	Massa Retida (g)	Fração passagem (R,%)	Fração retida (%)
1,41	> 1,41	1,705	0,53	99,47	0,53
0,840	1,410 ⊦ 0,840	1,125	19,56	79,91	20,09
0,250	0,840 ⊦ 0,250	0,545	20,26	59,65	40,35
0,177	0,250 ⊦ 0,177	0,213	36,21	23,44	76,56
Coletor	0,149 ⊦ 0,000	0,074	23,44	0	100

Figura 16 – Gráfico de distribuição granulométrica, sendo massa retida por intervalo de abertura média da malha, das cascas moídas, em moinho de martelos, de *S. terebinthifolius*.

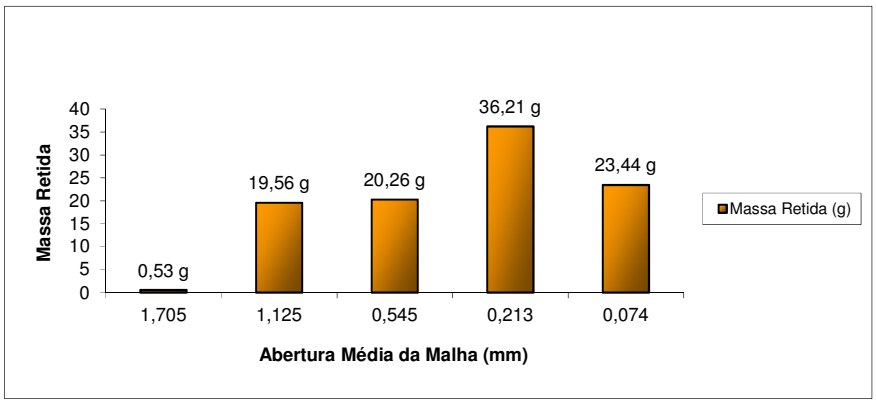
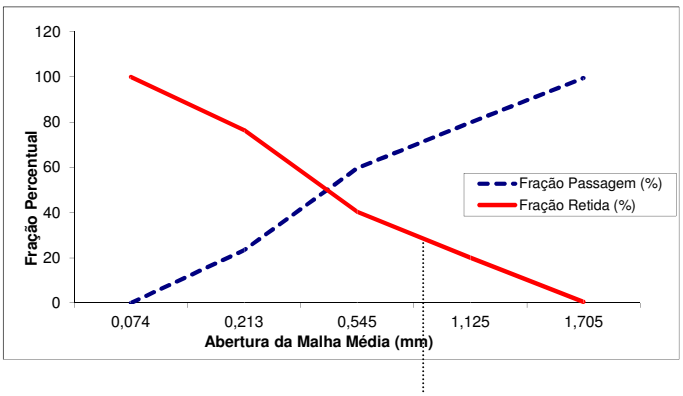


Figura 17 – Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da droga vegetal *S. terebinthifolius*.



A análise granulométrica é importante no controle de qualidade de uma droga vegetal, sendo essencial na obtenção de um extrato, uma vez que uma maior ou menor extração está intimamente relacionada com a área de superfície e dimensão das partículas em contato com o líquido extrator.

Na escolha do tipo de moinho devem ser considerados três aspectos principais: o princípio de funcionamento do mesmo, as características do material vegetal, como dureza, elasticidade e friabilidade, e as propriedades químicas dos constituintes de interesse. O desconhecimento desses aspectos pode levar à obtenção de pós com propriedades tecnológicas inadequadas.

5.3.1.3 Determinação da perda por dessecação

A avaliação do teor de umidade presente nas cascas de *S. terebinthifolius* foi determinada pelo método gravimétrico, que também é descrito nas Farmacopeias Britânica, Alemã e pela OMS, é mais adequadamente denominado perda por dessecação, pois determina o teor de água presente na droga vegetal pela volatilização.

Dependendo da umidade do ar, o teor de água na planta pode variar e dessa forma modificar os resultados de técnicas cujo peso da planta é importante, pois técnicas de determinação quantitativa necessitam do peso correto da droga vegetal, ou seja, sem água.

Assim, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas nas quais a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002).

O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14% para a droga seca, com poucas exceções especificadas nas monografias (FARIAS, 2007). A Farmacopeia Brasileira 5ª edição determina o teor de umidade de 8 a 14% para a droga vegetal seca.

O resultado da perda por dessecação para *S. terebinthifolius,* expresso em porcentagem foi de 9,65% ± 0,19 (CV 2,06%). Observando-se estes dados pode-se afirmar que o resultado obtido encontra-se dentro dos parâmetros estabelecidos.

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar a desenvolvimento de fungos e bactérias.

5.3.1.4 Determinação do teor de polifenóis totais

Procedeu-se de acordo com os dados obtidos na pré-validação: tempo de leitura 5 min, 780 nm como comprimento de leitura, carbonato de sódio anidro na concentração 14,06% e pirogalol como substância de referência. Foram realizadas três determinações de n=6. A droga vegetal demonstrou um teor de PT de 8,22% ± 0,34 [4,19%] ($\bar{x} \pm dp$ [CV%]).

5.3.2 Análise dos extratos brutos

5.3.2.1 Determinação do teor de resíduo seco

Na realização da determinação do resíduo seco, empregou-se a metodologia e os solventes descritos no item 4.6. Os resultados obtidos (RS) estão expressos, em porcentagem, na Tabela 8.

O resultado deste teste pode ser mais um parâmetro de avaliação da qualidade da droga vegetal, por ser um resultado próprio da *S. terebinthifolius*.

5.3.2.2 Determinação do teor de polifenóis totais

Estes ensaios destinam-se à determinação do teor de substâncias ativas presentes nas drogas vegetais. Geralmente é determinado o teor de um grupo de substâncias, como, por exemplo, derivados antraquinônicos de sene ou alcaloides de beladona.

Tabela 8 – Resultados, em porcentagem, do resíduo seco em diferentes soluções extrativas de amostras de cascas de *S. terebinthifolius*.

Extrato	**Solvente (v/v)**	**N**	**RS (%)** $\bar{x} \pm dp$ **(CV%)**
1	Água	4	1,35 ± 0,03 (2,76)
2	Etanol	4	1,39 ± 0,04 (3,52)
3	Acetona	4	1,05 ± 0,01 (1,41)
4	Água : Etanol (1:1)	4	2,18 ± 0,01 (0,65)
5	Etanol : Acetona (1:1)	4	1,78 ± 0,01 (0,34)
6	Água : Acetona (1:1)	4	2,18 ± 0,02 (1,06)
7	Água : Etanol : Acetona (1:1:1)	4	2,32 ± 0,01 (0,76)
8	Água : Etanol : Acetona (4:1:1)	4	2,39 ± 0,01 (0,75)
9	Água : Etanol : Acetona (1:4:1)	4	2,01 ± 0,01 (0,67)
10	Água : Etanol : Acetona (1:1:4)	4	2,20 ± 0,02 (0,99)
11	Água : Etanol (8:2)	4	2,18 ± 0,01 (0,15)

$\bar{x}$ = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

O teor de constituintes químicos de espécies vegetais pode variar consideravelmente com a época e local da coleta, formas de cultivo, condições climáticas, idade do material, período e condições de armazenamento, entre outros. Sendo assim, a definição do limite mínimo aceitável baseia-se em estudos científicos sistemáticos, os quais permitirão a definição dos teores em matérias-primas de qualidade aceitável.

Flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas e um grande número de grupos de compostos podem ser dosados empregando-se métodos titulométricos ou espectroscópicos, especialmente no UV e Vis. Esses métodos, normalmente, exigem extração e tratamento específico para cada grupo de substâncias. No entanto, a aplicação generalizada destas técnicas, em alguns casos é problemática, sendo necessárias adaptações da metodologia descrita para uma droga específica e imprescindível a sua validação, assim, para a determinação do teor de PT foram utilizadas as cascas secas e moídas pelo método de Folin-Ciocalteau otimizado pela pré-validação. Trata-se de um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico pelos compostos fenólicos.

Baseando-se nos mesmos princípios utilizados na determinação de polifenóis totais da droga vegetal *S. terebinthifolius*, foi realizado o doseamento nos extratos secos de 1 ao 11. A massa empregada na determinação do teor em polifenóis totais do extrato seco para todas as amostras foi de 0,0045 g, pois foi esta que mostrou absorvância próxima a 0,500. Os resultados obtidos estão expressos, em porcentagem, na Tabela 9. Após a determinação do teor de polifenóis totais dos extratos brutos a superfície de resposta e curvas de nível do simplex centroide foi calculada e está representada nas Figuras 18a e 18b respectivamente, no modelo cúbico especial, pois esse se mostrou significativo (Pvalor<0,05) no teste de análise de variância realizada pelo programa Statistica® para as interações entre os solventes puros.

Pode-se observar que a região vermelha escuro, entre número 7 e 9 é aquela que demonstra a melhor resposta quanto os polifenóis totais para os extratos produzidos de aroeira – da - praia.

Comparando-se os valores dos extratos de *S. terebinthifolius* com o extrato hidrocetônico de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze que apresenta teor de polifenóis totais de 23,5% (BLAINSKI, 2010) e com o extrato hidroetanólico de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (BUENO, 2010) que possui o teor de 22,74%, o teor de polifenóis totais de 22,58 a 33,17% encontrado em *S. terebinthifolius* pode ser considerado alto.

Tabela 9 - Resultados, em porcentagem, do teor de polifenóis totais (PT) dos extratos secos das cascas de *S. terebinthifolius*.

Extrato	Solvente (v/v)	PT (%) $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
1	Água	22,58 ± 0,74 (3,30)
2	Etanol	31,40 ± 0,85 (2,70)
3	Acetona	25,11 ± 0,96 (3,85)
4	Água : Etanol (1:1)	32,21 ± 1,00 (3,20)
5	Etanol : Acetona (1:1)	25,68 ± 0,40 (3,65)
6	Água : Acetona (1:1)	25,78 ± 0,46 (1,79)
7	Água : Etanol : Acetona (1:1:1)	29,91 ± 1,05 (3,53)
8	Água : Etanol : Acetona (4:1:1)	30,56 ± 1,16 (3,80)
9	Água : Etanol : Acetona (1:4:1)	31,32 ± 1,55 (4,95)
10	Água : Etanol : Acetona (1:1:4)	33,17 ± 0,45 (1,38)
11	Água : Etanol (8:2)	30,33 ± 0,97 (3,20)

$\bar{x}$ = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Figura 18 a - Superfície de resposta para a variável polifenóis totais na mistura água, álcool e acetona para os 11 EB de *S. terebinthifolius,* obtidos pelo simplex centroide.

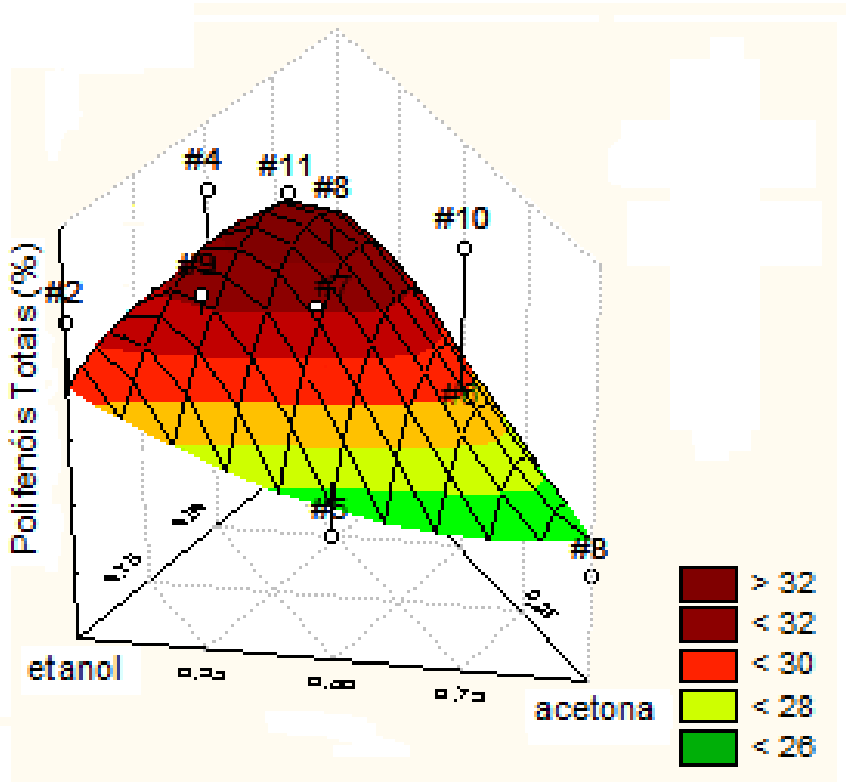
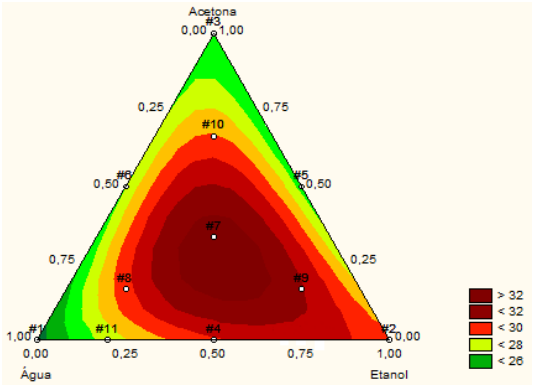


Figura 18 b - Curvas de nível para a variável polifenóis totais na mistura água, álcool e acetona para os 11 EB de *S. terebinthifolius.* Com equação: p = + 24,74 h + 29,48 e + 26,12 c + 10,59 he + 3,22 hc - 5,05 ec + 129,78 hec, onde p: polifenóis totais, h: água, e: etanol e c: acetona.



5.3.2.3 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Os resultados médios obtidos de IC_{50} ($\bar{x} \pm dp$ [CV%]) (µg/mL), seguindo a técnica de AMAROWICZ (2004) para a vitamina C foi de 5,63±0,03 [0,66] µg/mL e comparando com os 11 extratos produzidos, apresentados na Tabela 10. Pode-se notar que este possui um valor menor e mostrou-se estatisticamente diferente de todos os extratos.

Após a determinação do valor de IC_{50} dos extratos brutos a superfície de resposta e curvas de nível do simplex centroide foi calculada e está representada nas Figuras 19 a e 19 b, respectivamente, no modelo cúbico especial, pois este se mostrou significativo (Pvalor<0,05) no teste da análise de variância realizada pelo programa Statistica® para a interação entre os solventes puros.

Já para a atividade antioxidante, para analisar a região de melhor resposta dos extratos produzidos, deve-se observar toda a região verde, pois quanto menor o valor de IC_{50}, maior é o poder de redução do extrato frente ao radical livre DPPH.

O método é realizado à temperatura ambiente (25 °C) para que se elimine o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET et al., 1997). De acordo com a literatura, os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante devido à sua estrutura química e às suas propriedades de oxirredução, as quais permitem que atuem como agentes redutores, eliminando o oxigênio singleto e doando o hidrogênio. Assim, quanto maior o número de hidroxilas, maior será a atividade antioxidante (MORAIS et al., 2009).

Para a validação da metodologia de análise através do simplex centroide, um novo extrato foi produzido e as suas respostas (rendimento, polifenóis totais e concentração

inibitória) foram comparadas com aquelas obtidas dos 11 extratos produzidos pelo simplex centroide.

Tabela 10 - Resultados, em porcentagem, do IC_{50} dos extratos secos das cascas de *S. terebinthifolius*.

Extrato	Solvente (v/v)	IC50 $\bar{x} \pm dp$ (CV%)
1	Água	11,56 ± 0,24 (2,11)
2	Etanol	6,51 ± 0,36 (5,53)
3	Acetona	7,16 ± 0,05 (0,73)
4	Água : Etanol (1:1)	6,31 ± 0,18 (3,00)
5	Etanol : Acetona (1:1)	6,70 ± 0,33 (4,89)
6	Água : Acetona (1:1)	6,18 ± 0,24 (3,88)
7	Água : Etanol : Acetona (1:1:1)	6,61 ± 0,30 (4,58)
8	Água : Etanol : Acetona (4:1:1)	7,99 ± 0,37 (4,68)
9	Água : Etanol : Acetona (1:4:1)	6,65 ± 0,31 (4,70)
10	Água : Etanol : Acetona (1:1:4)	7,69 ± 0,18 (2,37)
11	Água : Etanol (8:2)	5,99 ± 0,26 (4,29)

$\bar{x}$ = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Figura 19 a - Superfície de resposta para a variável IC_{50} na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius.*

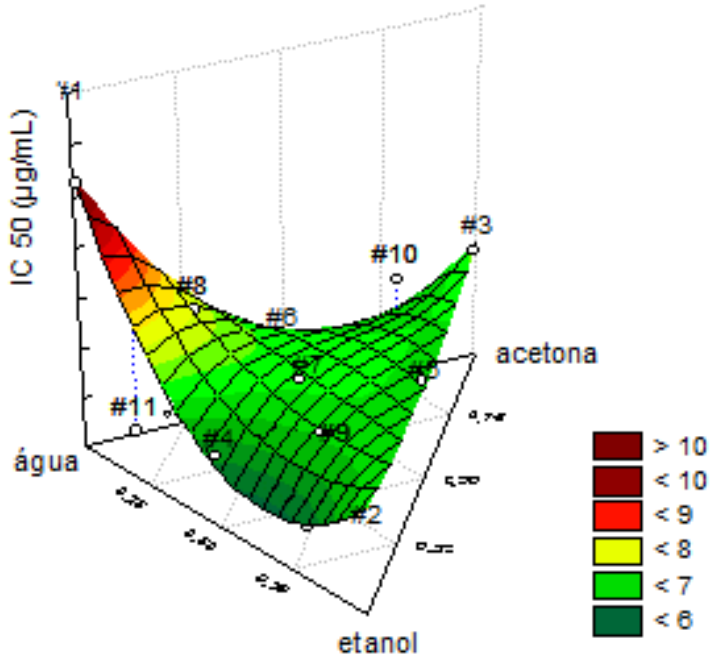
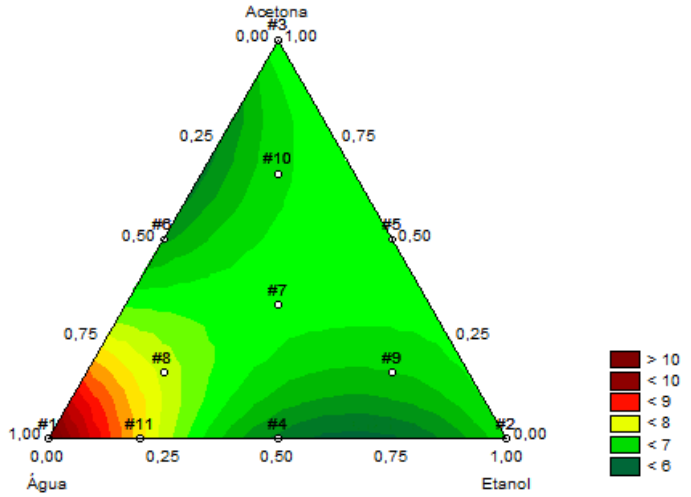


Figura 19 b - Curvas de nível para a variável concentração inibitória para DPPH (IC_{50}) na mistura água, álcool e acetona para os EB de *S. terebinthifolius.* I = + 10,41 h + 6,99 e + 7,22c - 10,10 he - 9,53 hc + 29,23 hec, onde i: IC_{50}, h: água, e: etanol e c: acetona.



O novo extrato produzido foi o nominado extrato 12 e o líquido extrator foi Água: Etanol (25:75, v/v), suas respostas foram:

- Rendimento: 20,89%
- Polifenóis Totais: 32,05% ± 1,38 [4,33] ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
- IC_{50}: 6,2287 µg/mL ± 0,23 [3,81] ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])

Os resultados do EB 12 se mostraram próximos àqueles obtidos nas outras figuras, tanto nas curvas de nível e superfícies de resposta para o rendimento, polifenóis e IC_{50}, assim houve a validação da metodologia de análise pelo simplex centroide.

5.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO DE *S. terebinthifolius* Raddi

Para se prosseguir com a validação, a escolha do melhor extrato se fez necessária. Assim para que essa fosse feita, foram analisadas as curvas das três respostas escolhidas (rendimento, polifenóis totais e atividade antioxidante), e a região de melhor resposta em comum entre as três foi observada e o extrato determinado foi o extrato 7.

Foi escolhida a metodologia por espectrofotometria UV-Vis pelo fato do espectrofotômetro ser de ampla disponibilidade no laboratório e de menor custo, quando comparado com o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), assim sendo, a metodologia sugerida é acessível e barata, garantindo assim possibilidade de análise de medicamentos que contém extrato de *S. terebinthifolius*.

5.4.1 Curva de calibração da substância de referência

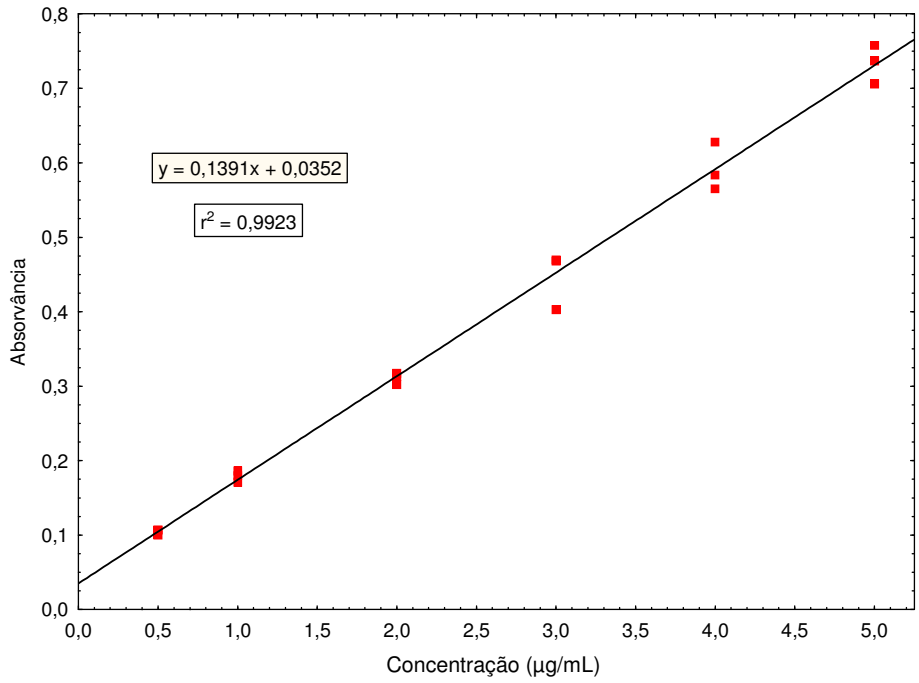
A substância de referência escolhida como padrão externo para a determinação de polifenóis totais no EB de *S. terebinthifolius* foi o pirogalol por apresentar a maior absortividade molar (Tabela 4).

Foi obtida a curva linear dessa substância após leitura das absorvâncias da amostra nas concentrações de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 µg/mL (Tabela 11 e Figura 20).

Tabela 11 - Concentrações da substância pirogalol utilizadas e as respectivas absorvâncias nos 3 testes para a obtenção da curva de calibração.

Concentração Pirogalol (µg/mL)	**Absorvância Teste 1**	**Absorvância Teste 2**	**Absorvância Teste 3**
0,5	0,100	0,107	0,107
1	0,180	0,186	0,171
2	0,302	0,313	0,317
3	0,468	0,403	0,47
4	0,565	0,584	0,628
5	0,706	0,737	0,758

Figura 20 - Curva de calibração do pirogalol na reação com reagente FolinCiocalteau.



Baseando-se nas análises dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, demonstrando uma distribuição normal para a amostra (Figura 21 e Figura 22).

Para verificar a linearidade do intervalo estudado, tem-se como hipóteses:

- H0: A curva não é linear
- H1: A curva é linear

De acordo com a Tabela 12 (ANOVA), tem-se F calculado maior que F Tabelado e Pvalor menor que α (0,05 – nível de significância), assim H0 foi rejeitada e concluiu-se que a curva estuda é linear.

Quanto à falta de ajuste tem-se outras duas hipóteses:

- H0: a curva apresenta erro por falta de ajuste
- H1: a curva não apresenta erro por falta de ajuste

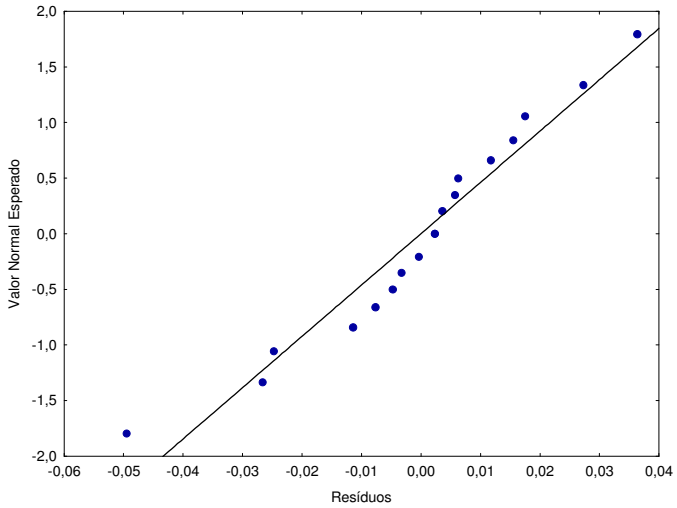
Para analisar a adequação do método e a significância estatística do modelo linear, três condições precisam ser satisfeitas: a 'soma do erro puro' deve ser maior que o 'erro por falta de ajuste'; o 'quadrado médio do erro por falta de ajuste' dividido pelo 'quadrado médio do erro puro' deve ser menor que o valor tabelado na distribuição "F" para determinado grau de liberdade e o Pvalor deve ser maior que α.

Tabela 12 - Análise estatística da curva de calibração do pirogalol quanto ao modelo, falta de ajuste e erro puro, onde SQ: soma quadrática dos resíduos, GL: graus de liberdade e QM: soma média dos quadrados (ANOVA).

	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo	0,882992	1	0,882992	2066,046	4,49	0,000000
Resíduo	0,006838	16	0,000427			
Falta de Ajuste	0,000207	4	0,000052	0,093862	3,26	0,982539
Erro Puro	0,006631	12	0,000553			

De acordo com a Tabela 12 (ANOVA), os valores obtidos na análise de resíduo para a curva analítica do pirogalol para 'soma do erro puro', 'erro por falta de ajuste', 'quadrado médio do erro por falta de ajuste', 'quadrado médio do erro puro' foram, respectivamente, 0,006; 0,0002; 0,00005 e 0,0005. Sendo o "F tabelado" para esses dados 3,26. Assim, o método satisfaz as condições estatísticas, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa.

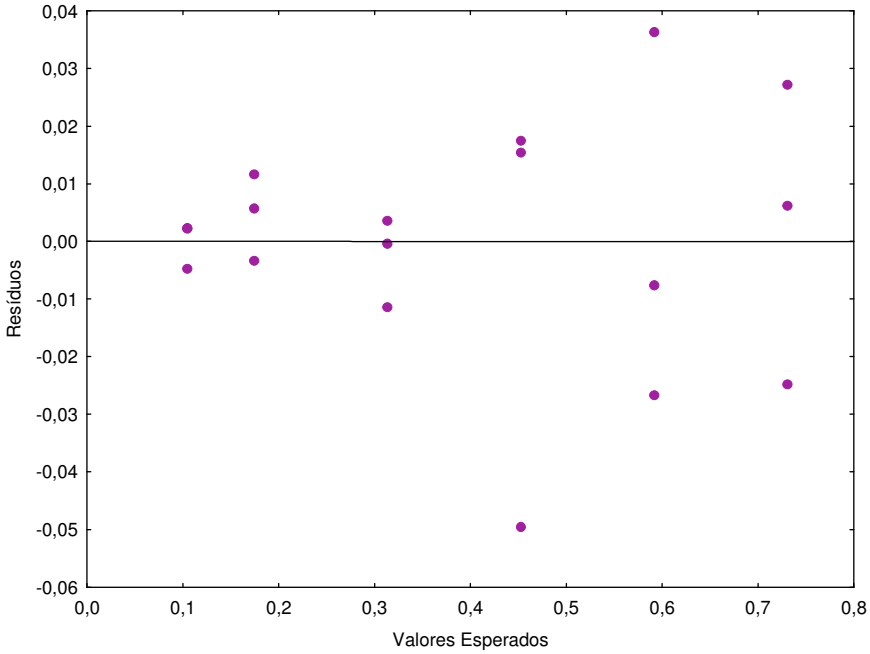
Figura 21 - Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.



5.4.2 Linearidade

Para esta análise foi realizada a metodologia descrita no item 4.7.2. As massas do EB de *S. terebinthifolius* utilizadas e suas respectivas absorvâncias estão descritas na Tabela 13 e Figura 23.

Figura 22 - Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.



Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Segundo a RE nº. 889/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) deve ser igual a 0,99. No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com resíduos altos no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear (RIBEIRO et al., 2008).

Tabela 13 - Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizadas e as respectivas absorvâncias nos 3 testes para a obtenção da curva de linearidade.

Concentração EB (µg/mL)	**Absorvância Teste 1**	**Absorvância Teste 2**	**Absorvância Teste 3**
4,95	0,293	0,270	0,289
7,47	0,408	0,389	0,418
10,98	0,550	0,556	0,567
14,4	0,746	0,748	0,743
17,28	0,914	0,886	0,887

Na determinação da melhor faixa de aplicação, foram utilizadas análises estatísticas. Baseando-se nas análises dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, demonstrando uma distribuição normal para a amostra (Figura 24 e Figura 25).

Para verificar a linearidade do intervalo estudado, tem-se como hipóteses:

- H0: A curva não é linear
- H1: A curva é linear

De acordo com a Tabela 14 (ANOVA), tem-se F calculado maior que F tabelado e Pvalor menor que α (0,05 – nível de significância), assim rejeita-se H0 e concluiu-se que a curva estudada é linear.

Tabela 14 - Análise estatística do teste de linearidade quanto ao modelo, falta de ajuste e erro puro, onde SQ: soma quadrática dos resíduos, GL: graus de liberdade e QM: soma média dos quadrados (ANOVA).

	SQ	GL	QM	F	F tabelado	p-valor
Modelo	0,736065	1	0,736065	3489,436	4,67	0,000000
Resíduo	0,002742	13	0,000211			
Falta de Ajuste	0,001340	3	0,000447	3,186480	3,71	0,071506
Erro Puro	0,001402	10	0,000140			

Quanto à falta de ajuste tem-se outras duas hipóteses:

- H0: a curva apresenta erro por falta de ajuste
- H1: a curva não apresenta erro por falta de ajuste

Logo, tem-se em nível de confiança de 95%, que o "F tabelado" para esses dados é 3,71 e o Pvalor é 0,071506, assim rejeitou-se H0 e concluiu-se que o método satisfaz as condições estatísticas, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa.

Figura 23 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta, obtidos pela relação de cindo diferentes concentrações de EB de *S. terebinthifolius* pelas absorvâncias obtidas na reação com reagente Folin-Ciocalteau.

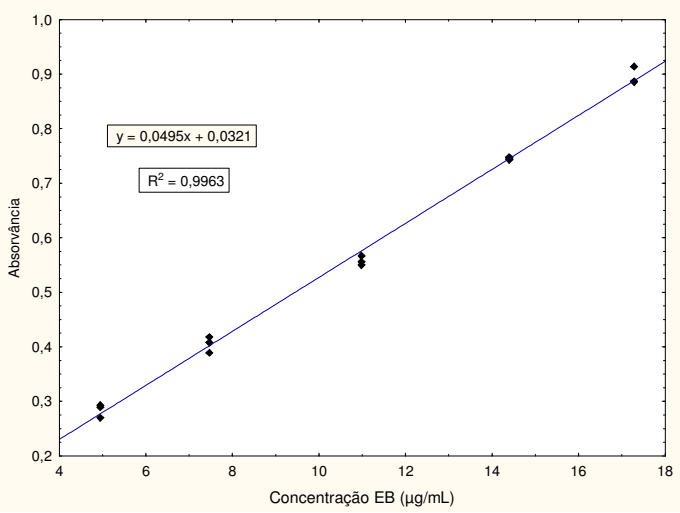


Figura 24 - Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para PT das amostras de EB *S. terebinthifolius.*

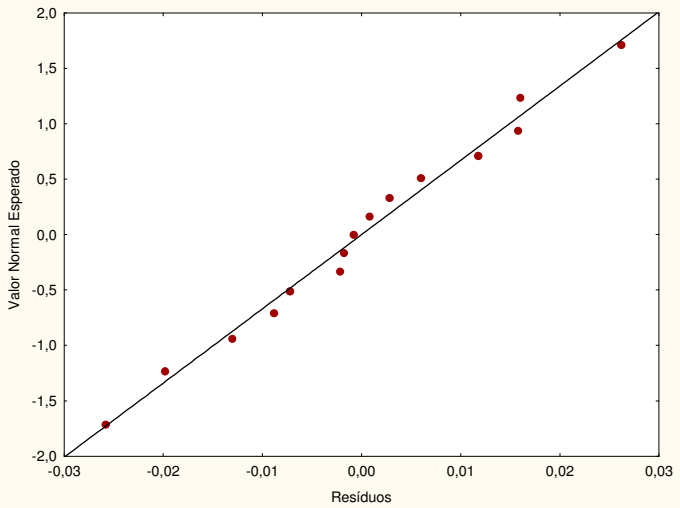
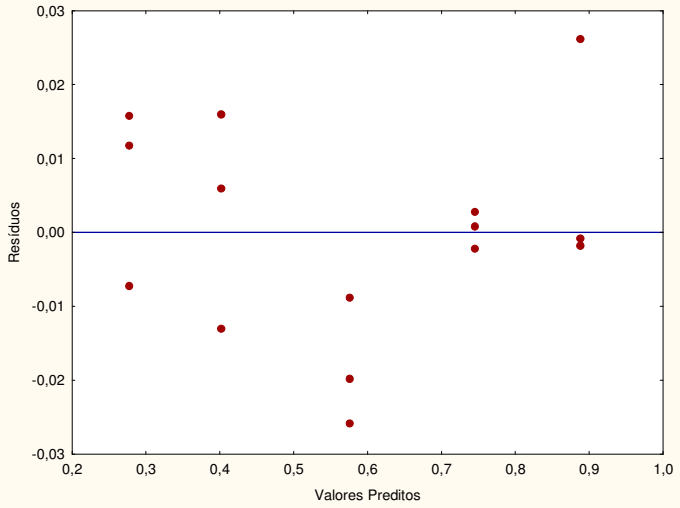


Figura 25 - Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de *S. terebinthifolius.*



5.4.3 Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

As médias das absorvâncias estão apresentadas na Tabela 15 e representadas na Figura 26 de acordo com a metodologia proposta. Assim, foram adicionados 40 µL de uma solução de pirogalol 2,5 µg/mL ao microtubo tipo eppendorf nas concentrações descritas no

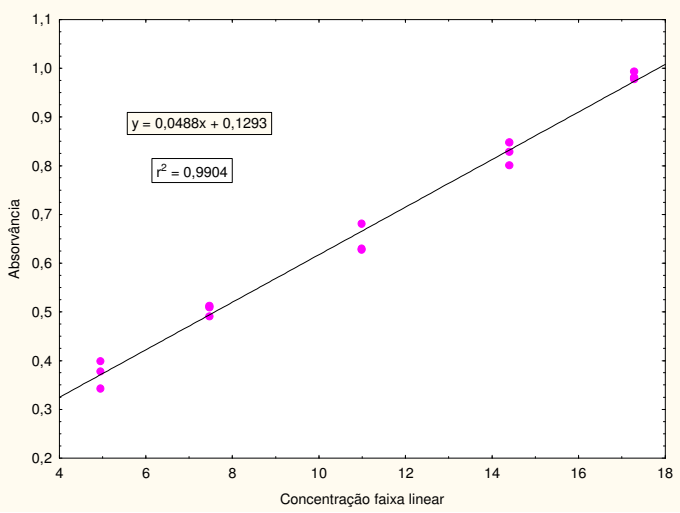
teste de linearidade, resultando na concentração final de pirogalol de 0,5 µg/mL. Realizou-se o teste em triplicata.

Baseando-se nas análises estatísticas dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, assim a amostra segue uma distribuição normal (Figura 27 e Figura 28) e pode-se dizer que há linearidade do método para a análise de PT.

Tabela 15 - Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizada acrescida de substância referência e as respectivas absorvâncias médias (n=3) obtidas no teste de especificidade.

Concentração (µg/mL) EB + 40 µL de pirogalol	Absorvância PT Teste 1	Absorvância PT Teste 2	Absorvância PT Teste 3
4,95	0,378	0,343	0,399
7,47	0,510	0,513	0,491
10,98	0,681	0,630	0,628
14,4	0,829	0,801	0,848
17,28	0,981	0,978	0,994

Figura 26 - Representação da curva de especificidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta para PT, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de *S. terebinthifolius (µg/mL)* + 40 µL de pirogalol e as absorvâncias obtidas pela reação com reagente Folin-Ciocalteau.



Para a comprovação da especificidade do método, é necessário que a curva analítica de EB + substância referência apresente linearidade. Conforme discutido para o teste de linearidade, além do valor do coeficiente de correlação, são necessários testes estatísticos para a análise dos resíduos.

Para verificar a linearidade do intervalo estudado, tem-se como hipóteses:

- H0: A curva não é linear
- H1: A curva é linear

De acordo com a Tabela 16 (ANOVA), tem-se F calculado (1345,94) maior que F tabelado (4,67) e Pvalor (0,00) menor que α (0,05 – nível de significância), assim rejeitou-se H0 e concluiu-se que a curva estudada é linear.

Tabela 16 - Análise estatística do teste de especificidade quanto ao modelo, falta de ajuste e erro puro, onde SQ: soma quadrática dos resíduos, GL: graus de liberdade e QM: soma média dos quadrados (ANOVA).

	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado	p-valor
Modelo	0,715049	1	0,715049	1345,941	4,67	0,000000
Resíduo	0,006906	13	0,000531			
Falta de Ajuste	0,001954	3	0,000651	1,314948	3,71	0,323321
Erro Puro	0,004953	10	0,000495			

Quanto à falta de ajuste tem-se outras duas hipóteses:

- H0: a curva apresenta erro por falta de ajuste
- H1: a curva não apresenta erro por falta de ajuste

Figura 27 - Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB *S. terebinthifolius.*

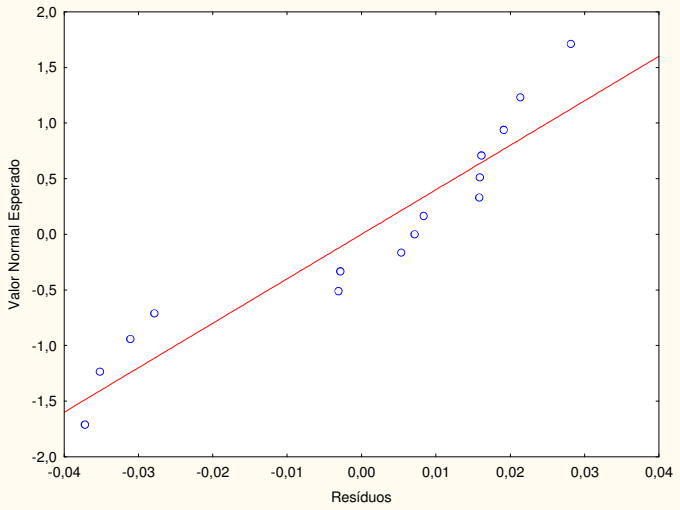
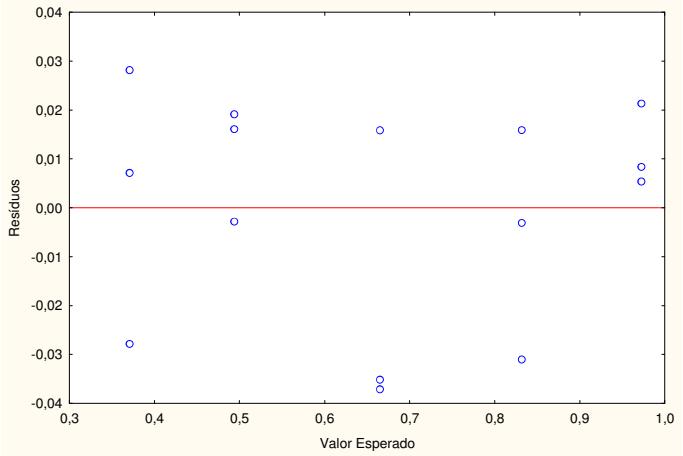


Figura 28 - Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de *S. terebinthifolius*.



A observação dos resultados obtidos nestes testes (Figuras 27 e 28) confirma a linearidade da curva analítica. Sendo o “F tabelado” para esses dados (3,71), o método satisfaz as condições estatísticas, assim como no teste de linearidade, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa.

Na comparação da curva de PT da linearidade entre EB de *S. terebinthifolius* e EB + pirogalol, pode-se observar que há uma diferença de cerca de 1,41% no coeficiente angular da análise de PT.

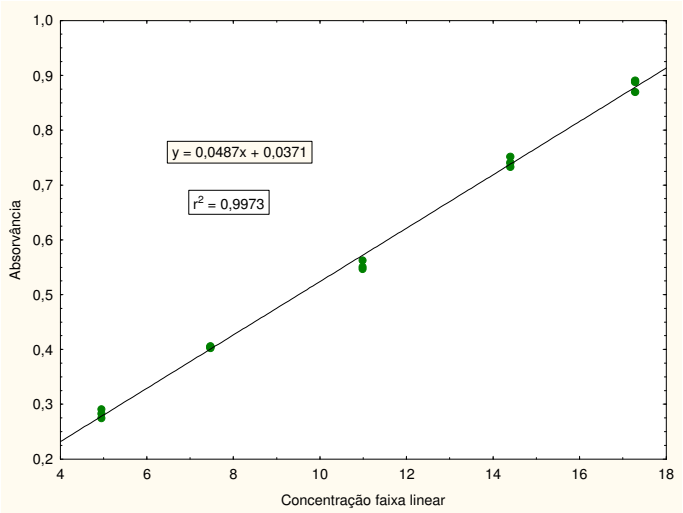
5.4.4 Seletividade

As absorvâncias obtidas para PT estão representadas na Tabela 17 e na Figura 29. Comparando esses valores e a equação da reta com os resultados obtidos pela amostra na faixa linear (4,95 a 17,28 µg/mL) sem adição de cafeína - item 5.7.2, verifica-se que não há diferença significativa entre as absorvâncias para os testes de PT e a equação da reta é paralela, podendo-se observar que há uma diferença de cerca de 1,61% no coeficiente angular da curva obtida no teste de linearidade.

Tabela 17 - Concentração de EB de *S. terebinthifolius* utilizada acrescida de cafeína e as respectivas absorvâncias (n=3) obtidas no teste de seletividade.

Concentração (µg/mL) EB + 40 µL de cafeína	Absorvância PT Teste 1	Absorvância PT Teste 2	Absorvância PT Teste 3
4,95	0,291	0,275	0,283
7,47	0,406	0,403	0,405
10,98	0,551	0,547	0,563
14,4	0,741	0,733	0,752
17,28	0,870	0,891	0,888

Figura 29 - Representação gráfica das absorvâncias de PT na faixa de concentração linear de EB *S. terebinthifolius* (µg/mL)acrescidas de cafeína utilizadas na determinação do teste de seletividade para reação com Folin-Ciocalteau.



5.4.5 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo

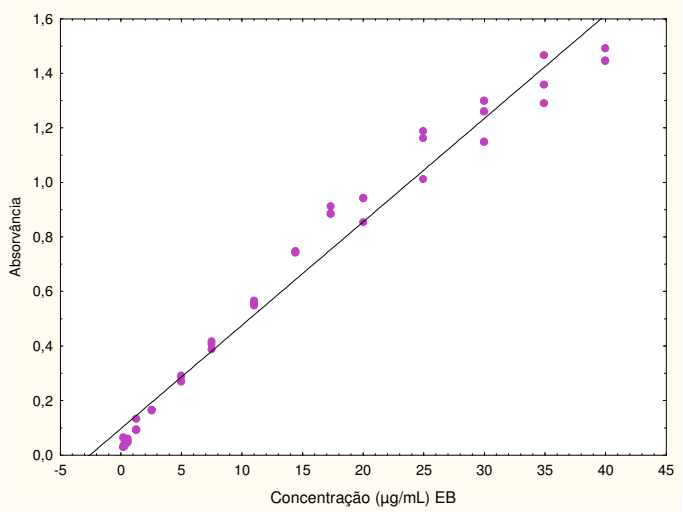
O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada e diferenciada do ruído, mas não necessariamente quantificada e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão. O intervalo é considerado como a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, o qual confirma que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade. O LD e LQ podem ser estabelecidos através da

análise de soluções com concentrações conhecidas decrescentes do analito, até se chegar ao menor nível detectável e quantificável, respectivamente (BRASIL, 2003).

Podem ser determinados a partir de três métodos diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Este estudo foi realizado pela leitura da absorvância de sucessivas diluições da amostra, a partir da menor concentração do teste de linearidade (4,95 µg/mL) e pela preparação de amostras de concentração superior à maior concentração de teste de linearidade (17,28 µg/mL) (Figura 23). Os resultados encontram-se representados na Figura 30 e apresentados na Tabela 18.

Figura 30 - Representação gráfica das absorvâncias de PT de diferentes massas de EB *S. terebinthifolius* utilizadas na determinação do intervalo de quantificação e limite de detecção para reação com Folin-Ciocalteau.



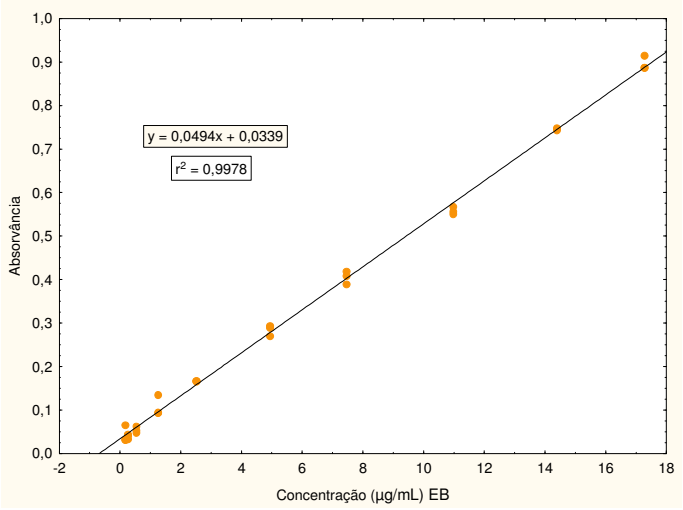
Os limites de detecção e quantificação inferior podem ser calculados, de acordo com o preconizado pela RE nº. 899 (BRASIL, 2003), considerando a equação da reta da curva de linearidade (y= 0,0495x + 0,0321). O desvio padrão do intercepto com o eixo y é 0,0099 e a inclinação da reta é 0,0495. Assim, os limites de detecção e quantificação inferior seriam, respectivamente, 0,6 e 2 µg/mL. O limite de quantificação superior foi determinado pela última concentração da amostra que apresentou linearidade e não apresentou erro por falta de ajuste (17,28 µg/mL).

O intervalo 2,0 a 17,28 µg/mL apresenta concentrações com linearidade, exatidão e precisão.

Tabela 18 - Absorvâncias de diferentes concentrações de EB de *S. terebinthifolius* obtidas na reação de Folin-Ciocalteau para PT para a determinação do intervalo de quantificação e o limite de detecção.

Concentração (µg/mL) EB	Absorvância Teste 1	Absorvância Teste 2	Absorvância Teste 3
0,18	**0,065**	**0,031**	**0,031**
0,27	**0,04**	**0,033**	**0,044**
0,54	**0,062**	**0,053**	**0,047**
1,26	**0,094**	**0,093**	**0,134**
2,52	**0,167**	**0,165**	**0,167**
4,95	**0,293**	**0,27**	**0,289**
7,47	**0,408**	**0,389**	**0,418**
10,98	**0,55**	**0,556**	**0,567**
14,4	**0,746**	**0,748**	**0,743**
17,28	**0,914**	**0,886**	**0,887**
19,98	0,943	0,855	0,944
24,93	1,189	1,014	1,164
29,97	1,300	1,150	1,261
34,92	1,467	1,291	1,360
39,96	1,446	1,447	1,492

Figura 31 - Curva de linearidade dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação para EB *S. terebinthifolius* na reação da reagente Folin-Ciocalteau.



5.4.6 Precisão

A precisão é considerada como uma avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de amostragens múltiplas de uma mesma amostra, sendo analisada pela precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Pode ser expressa através do coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação. A concordância ocorre entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

De acordo com a RE nº. 899, de 23 de maio de 2003, os valores encontrados para o coeficiente de variação não devem ser superiores a 5%. Portanto, pode-se afirmar que o método apresenta repetibilidade para determinação de polifenóis totais, como observado na Tabela 19.

O teor de polifenóis totais foi obtido para amostras (n=6) de 10,98 µg/mL de EB de *S. terebinthifolius* e o teste foi realizado em 3 dias diferentes (precisão intermediária) e em cada um desses dias duas análises foram feitas, uma no período da manhã e outra no período da tarde para se analisar a repetibilidade (Tabela 19), e observando o coeficiente de variação nota-se que os resultados apresentam-se dentro do valor permitido pela legislação, de no máximo 5%.

Na análise estatística, observa-se que não há diferença significativa nas análises intra-dia e inter-dias.

5.4.7 Exatidão

As absorvâncias obtidas estão na Tabela 20 e as absorvâncias teóricas foram determinadas pela soma da absorvância obtida nessa concentração no teste de linearidade (0,557) e as absorvâncias esperadas pelo pirogalol determinadas pela equação da reta da curva de calibração no item 5.7.1.

Tabela 19 - Teor de PT obtidos no teste de precisão com amostras de 10,98 µg/mL de EB de *S. terebinthifolius.*

	Dia 1	**Dia 2**	**Dia 3**
Amostra (n=6)	**Teor de PT**	**Teor de PT**	**Teor de PT**
1	36,63	35,82	32,69
2	35,33	36,82	34,37
3	35,34	35,34	34,47
4	35,45	35,04	34,58
5	32,74	34,13	33,47
6	34,77	33,89	37,59
$\bar{x} \pm dp$ **[CV(%)]**	35,05±1,28 [3,66]	35,17 ±1,08 [3,08]	34,53±1,66 [4,83]
	Dia 1	**Dia 2**	**Dia 3**
Amostra (n=6)	**Teor de PT**	**Teor de PT**	**Teor de PT**
1	33,01	35,68	34,01
2	33,52	36,32	33,92
3	33,00	35,34	34,06
4	35,68	35,40	34,18
5	33,75	33,47	32,14
6	35,47	34,25	34,15
$\bar{x} \pm dp$ **[CV(%)]**	34,07±1,19 [3,51]	35,08±1,03 [2,95]	33,74 ±0,79 [2,34]
Entre o dia $\bar{x} \pm dp$ **[CV(%)]**	34,56±0,68 [1,98]	35,13±0,06 [0,19]	34,14±0,55 [1,62]
Entre os 3 dias $\bar{x} \pm dp$ **[CV(%)]**	34,75±0,72 [2,09]		

$\bar{x}$ =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

O índice de recuperação aceitável para matriz complexa pode variar entre 85 e 115% segundo a RE nº. 899/2003. Os resultados apresentados na Tabela 20 demonstram que a recuperação obtida nas três concentrações utilizadas foi aceitável. Assim pode-se dizer que há exatidão no método, pois, a exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Tabela 20 - Médias das absorvâncias obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação do EB de *S. terebinthifolius* (10,98 µg/mL) na análise de PT.

	Absorvância esperada (extrato + pirogalol)	**Absorvância obtida ($\bar{x} \pm dp$)** [CV%]	**Recuperação (%)**
Baixa	0,661 (0,557+0,104)	0,612±0,014 [2,37]	92,42
Média	0,736 (0,557+0,179)	0,691±0,019 [2,81]	93,89
Alta	0,840 (0,557+0,283)	0,794±0,031 [4,02]	94,45

$\bar{x}$ =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

5.4.8 Robustez

Os dados (Tabela 21) obtidos foram comparados estatisticamente com o resultado da absorvância obtida na amostra de concentração 10,98 µg/mL (0,557±0,008 [1,54]) no teste de linearidade para a análise de PT, observando-se que há diferença significativa 5,26% menor.

Assim o método não foi considerado robusto, confirmando a teoria já encontrada na literatura de que os polifenóis sofrem degradação na presença de luz, confirmando que o extrato bruto de *S. terebinthifolius* necessita obrigatoriamente de proteção contra a luz.

Tabela 21 - Médias das absorvâncias (n=3) obtidas no teste de robustez de EB de *S. terebinthifolius* 10,98 µg/mL na análise de PT.

	Absorvância ($\bar{x} \pm dp$) [CV(%)]
Sem proteção da luz	0,517 ± 0,021 [4,24]
Com proteção de luz	0,557 ± 0,008 [1,54]

$\bar{x}$ =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

6 CONCLUSÕES

As análises deste trabalho apresentaram parâmetros adequados para o controle de qualidade qualitativo e quantitativo adequado para as cascas de *S. terebinthifolius* Raddi. O teor de umidade cumpre as especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

A análise macro e microscópica atendem ao descrito na monografia de *S. terebinthifolius* constante na Farmacopéia Brasileira 1ª Edição de 1929.

Na padronização de metodologia analítica novos parâmetros foram estabelecidos: o pirogalol apresentou a maior absortividade molar, sendo a substância de escolha para a metodologia de determinação do teor de polifenóis totais; o tempo de análise foi determinado em 5 minutos após adição do reagente carbonato de sódio anidro por demonstrar estabilização e o comprimento de onda para se fazer a leitura dessa reação foi de 780 nm.

A análise pelo simplex centroide de 3 vértices (água, etanol e acetona) das respostas rendimento, polifenóis totais e capacidade antioxidante, totalizando 11 extratos brutos diferentes, demonstrou que o extrato 7 – água:etanol:acetona (1:1:1) apresentou os melhores resultados. Análise foi validada pela produção do EB 12 água:etanol (25:75, v/v) , cujos valores para as respostas se enquadrou naquelas obtidas para os 11 EB.

A determinação polifenóis totais no EB de *S. terebinthifolius do* Extrato 7 Água : Etanol : Acetona (1:1:1, v/v) mostrou-se confiável no intervalo de quantificação de 2,0 a 17,28 µg/mL, cujos resultados dos parâmetros avaliados (linearidade, precisão e exatidão) foram satisfatórios, apresentando requisitos mínimos aceitáveis estipulados pela RE nº. 899/2003, garantindo que o método é válido. Essa metodologia mostrou-se aplicável à rotina laboratorial para controle de qualidade, uma vez que polifenóis são moléculas de alta complexidade e de difícil padronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, v. 85, p. 513 -518, 2004.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chemistry,* v. 84, p. 551-562, 2004. 1979-1983, 1983.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 8. ed, Baltimore: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 738 p., 2005.

ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, v. 107, p. 21-29, 2007.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R., 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: *Human Medicinal Agents from Plants*, ACS Symposium Series 534, 1993, Washington, USA, American Chemical Society ISBN 0-8412-2705-5, p. 2-12., 1993.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; *Como fazer experimentos*. 4 ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 414 p, 2010.

BARROSO, G.M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*, v.2, p. 266,1991.

BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2010.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780> Acesso em 08 out. 2011.

BRASIL, Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília-DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Leis, decretos, etc. Resolução (RE) n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos estratégia e discussão. *Pesticidas Ecotoxicologia e Meio Ambiente,* v.13, p. 129-146, 2003.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WHARTA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). *Ciências e Tecnonologia de Alimentos,* v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BUENO, F.G. Controle de qualidade, desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação da atividade cicatrizante de *Caesalpinia peltophoroides* BENTH. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2010.

BUENO, F.G.; MARCHARETH, M.A.D.; PANIZZON, G.P.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Development of a UV/Vis spectrophotometer method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* BENTH. *Química Nova, 2012 in press.*

CARDOSO, M.L.C. Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach – Malpighiaceae – (nó-de-cachorro). 2002. 128 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia*: da planta ao medicamento*. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 20, p. 433-449.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M**.** *Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica.* Editora: Vozes, 4 ed, 2001.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984. p. 170-171.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova,* vol. 29 n. 6. São Paulo, 2006.

DECENA, D.C.D.; CO, J.T.; MANALASTAS Jr., R.M.; PALAYPAYON, E.P.; PADOLINA, C.S.; SISON, J.M.; DANCEL, L.A.; LELIS, M.A. Metronidazole with lactacyd vaginal gel in bacterial vaginosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. v. 32, n. 2, p. 243-251, 2006.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, v.5, n.2, p. 85-90, 2004.

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. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. *12,* p. 5265 – 5270, 2009.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Council of Europe. Determination of tannins in herbal drugs. European Directorate for the Quality of Medicines, 6. Ed., p. A286, 2007.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M. O., Introdução à análise fitoquímica In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap. 10, p. 229 – 245, 2007.

FARIAS, M.R, Avaliação da qualidade In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap. 12, p. 263 – 288, 2007.

FARMACOPEIA Brasileira. 1 ed. São Paulo. Companhia Editora Nacional, 1929.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

GERLACH, G. *Botanische Microtechnik*, eine Einführung. Stuttgart: George Thieme, 1969.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall. 3. ed. 1998.

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

HASLAM, E. Pratical Polyphenolic from structure to molecular recognotion and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1 ed., 1998, p 10-83.

HELMAN, J. *Farmacotecnica teorica y practica*. 3 ed. Mexico: Continental, 1982.

ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on] growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.942-949, 2006.

JOLY, A.B. *Botânica*: Introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

KRULL, I.S.; STWARTZ, M.E. Validação de métodos cromatográficos. Pharmaceutical Technology, p 12-20, 1998.

LEAL; L.B. Preparação e avaliação biofarmacêutica de formas semi-sólidas da aroeira – da - praia *Schinus terebinthifolius* Raddi. 132 f, 1999. Dissertação (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 1999.

LIMA, C.R.; COSTA-SILVA, J.H.; LYRA, M.M.A.; ARAÚJO, A.V.; ARRUDA, V.M.; DIMECH, G.S.; EVÊNCIO, L.B.; FRAGA, M.C.; LAFAYETTE, S.S.L.;WANDERLEY, A.G. Atividade cicatrizante e estudo toxicológicopré-clínico do fitoterátipo Sanativo®. Acta farmacêutica bonaerense, v.25. n. 4, p. 544-549, 2006.

LIMA, E.O.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. *Infarma,* v. 16, n. 7-8, 2004.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; CARVALHO, C. M.; SANT'ANA, A. E. G.; ARGOLO, A. C. C. M.; ABREU, F. C.; ARGÔLO, A.C.C.M.; SANT'ANA, A.E.G. Ação antioxidante e moluscicida da espécie *Schinus terebinthifolius*. In: *Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.* Águas de Lindóia, 2006.

LONNI, A.A.S.G., LONGHINI, R., LOPES, G.C., MELLO, J.C.P., SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua. Analytica Chimica Acta, 2011.* doi:10.1016/j.aca.2011.12.053.

LOPES, G.C. *Estudos botânicos, químicos e biológicos de cascas e extratos de Stryphnodendron polyphyllum Mart., Leguminosae*. 197 f, 2003. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, 2003.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 624 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas. 2 ed. Nova Odessa, p.56, 2008.

MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.* 2. ed.. Fortaleza, IU, 2000.

MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense,* v.19, n.3, p. 211-215, 2000.

MELLO, J.P.C. de. *Desenvolvimento galênico de macerados de Baccharis trimera (Less.) DC. – Compositae – (Carqueja).* 135 f, 1989. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1989.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI E.S.B.; COSTA S.M.O.; AGUIAR L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev Bras Farmacogn 19:* 315-320, 2009.

NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M.Z. Use of reference compound in antioxidant activity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 5452-5460, 2007.

NIERENSTEIN, M. Catechutannins: Paullinia cupana**.** *Journal of the Chemical Society*, erkin Transactions I, p. 23-28, 1922.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. *Fundamentos de farmacobotânica*. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 263-267.

PITSOUNI, E.; IAVAZZO, C.; FALAGAS, M.E. Itraconazole vs fluconazole for the treatment of uncomplicated acute vaginal and vulvovaginal candidiasis in nonpregnant women: a metanalysis of randomized controlled trials. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* v. 198, n. 2, p. 153-160, 2008.

RATMAN, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHARA, D.K.; KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, v.113, p.189-207, 2006.

RENZ, S.V. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, no programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS no primeiro

semestre de 2003. Disponível em: www.ufrgs.br/bioquimica. Acesso em: 6 de fevereiro de 2007 apud OLDONI, T.L.C. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação ESALQ/USP, Universidade de Sao Paulo, 104 p, Piracicaba, 2007.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista de Enfermagem*, v.36, p.282-288, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 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. *Revista Odonto Ciências*, v.21, n.53, p. 245-252, 2006.

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

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotecnologia.* São Paulo: Editorial Premier. 1. ed. 1997. p.149-162, 207.

SANTOS L.C.; AMORIM, M.M.R. Uso da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para tratamento de infecções vaginais. *Femina;* v. 30, p. 339-342, 2002.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; FERNANDES, C.F.; SILVA, A.G.; LIMA, D.K.S.; TEIXEIRA, C.A.D.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticidade so óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides* obectus Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Revista Fitos, v. 3, p.77-83, 2007.

SANTOS, P.L.; SANTOS, A.C.A.; SERAFINI, L.A.; ROSSATO, M.; PAULETTI G. F. Determinação da composição química e do rendimento do óleo essencial de folhas e talos de *Schinus terebinthifolius* RADDI. 2004. Disponível em: <http://www.ucs.br/ucs/tplJovensPesquisadores2004/pesquisa/jovenspesquisadores2004/programacao/trabalhos_pdf/vida/paulalucianadossantos.pdf>. Acesso em: 22 de julho de 2006.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap. 24, p. 615 – 656, 2007.

SCHEFFÉ, H; Experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological),* v. 20, n. 2 p. 344-360, 1957.

SCHWANZ, M. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade. 81 f, 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen sppecies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.18, p.567-579, 2007.

SILVA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; DINIZ, M.F.F.M.; TAKEMURA, O.S. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Conocliniopsis prasiifolia* R.M. King & H. Robison na resposta celular de neutrófilos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.569-572, 2008.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of tatal phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p. 152-178, 1999

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.;

GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap. 13, p. 289 – 326, 2007.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; 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. *Química Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p.432-434.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de Psidium guajava L., *Química Nova*, São Paulo, SP, v. 30, n. 4, p. 815-820, jul./ago. 2007.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmacias com manipulacao e indicadas para diversos tipos de doencas pela metodologia de DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.384-387, 2007.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v.51, p.239-254, 1996.

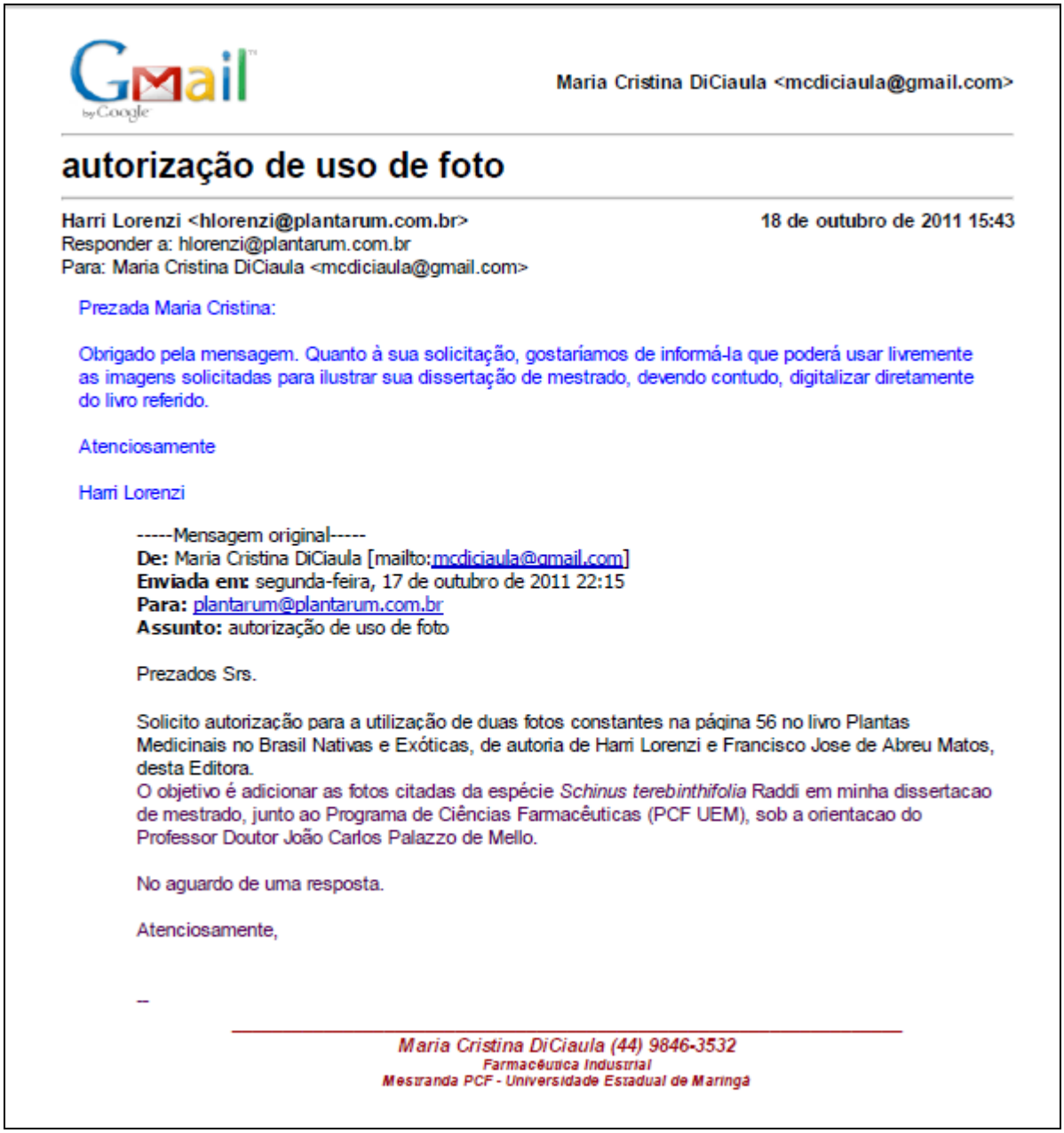
WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the appropriate use of herbal medicines.* Manila, 1998.

YAMADA, C. S. B. Fitomedicamentos: a importância do controle de qualidade na produção. In: Lima, S.M.R.R. *Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica.* Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.D.; USHIROBIRA, T.M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevetion of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*, v. 12 (8), p. 1950 – 1963, 2007.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A.; Flavonoide. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap. 23, p. 577 - 614, 2007.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DO USO DE FOTO



Gmail by Google

Maria Cristina DiCiaula <mcdiciaula@gmail.com>

autorização de uso de foto

Harri Lorenzi <hlorenzi@plantarum.com.br> **18 de outubro de 2011 15:43**
Responder a: hlorenzi@plantarum.com.br
Para: Maria Cristina DiCiaula <mcdiciaula@gmail.com>

Prezada Maria Cristina:

Obrigado pela mensagem. Quanto à sua solicitação, gostaríamos de informá-la que poderá usar livremente as imagens solicitadas para ilustrar sua dissertação de mestrado, devendo contudo, digitalizar diretamente do livro referido.

Atenciosamente

Harri Lorenzi

-----Mensagem original-----
De: Maria Cristina DiCiaula [mailto:mcdiciaula@gmail.com]
Enviada em: segunda-feira, 17 de outubro de 2011 22:15
Para: plantarum@plantarum.com.br
Assunto: autorização de uso de foto

Prezados Srs.

Solicito autorização para a utilização de duas fotos constantes na página 56 no livro Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas, de autoria de Harri Lorenzi e Francisco Jose de Abreu Matos, desta Editora.
O objetivo é adicionar as fotos citadas da espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi em minha dissertacao de mestrado, junto ao Programa de Ciências Farmacêuticas (PCF UEM), sob a orientacao do Professor Doutor João Carlos Palazzo de Mello.

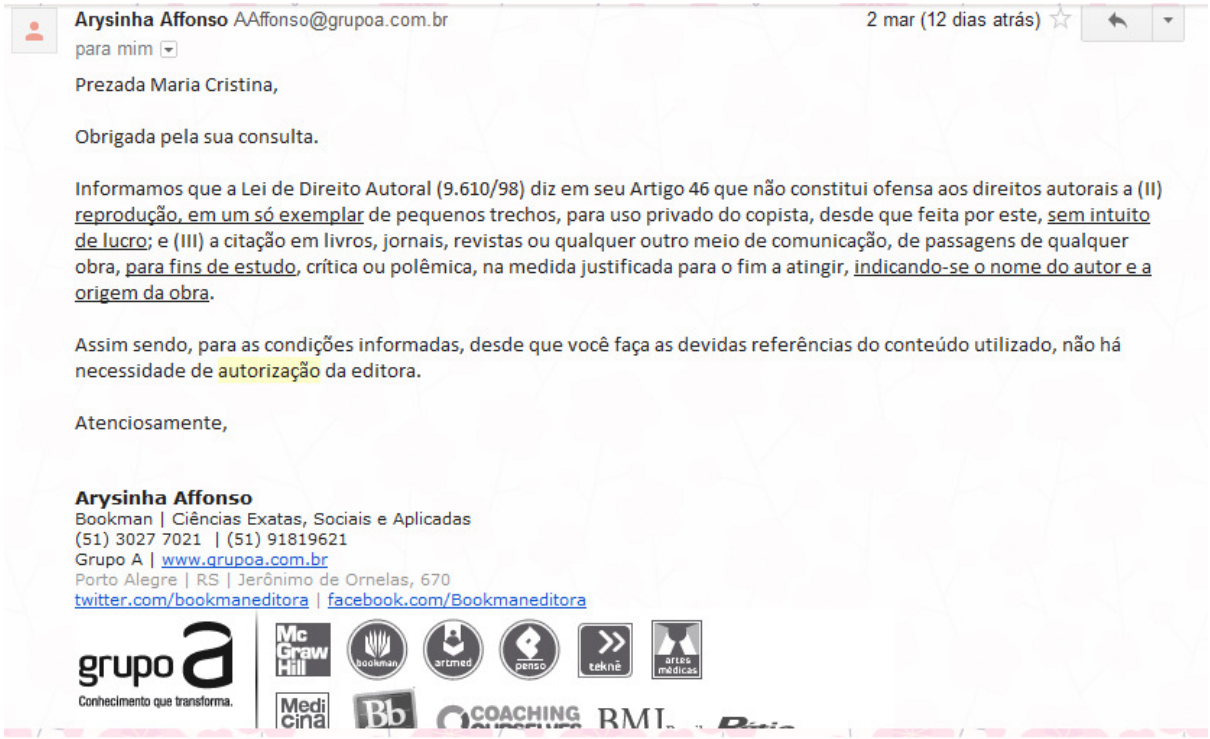
No aguardo de uma resposta.

Atenciosamente,

–

Maria Cristina DiCiaula (44) 9846-3532
Farmacêutica Industrial
Mestranda PCF - Universidade Estadual de Maringá

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DO USO DE FOTO



Arysinha Affonso AAffonso@grupoa.com.br 2 mar (12 dias atrás)

para mim

Prezada Maria Cristina,

Obrigada pela sua consulta.

Informamos que a Lei de Direito Autoral (9.610/98) diz em seu Artigo 46 que não constitui ofensa aos direitos autorais a (II) reprodução, em um só exemplar de pequenos trechos, para uso privado do copista, desde que feita por este, sem intuito de lucro; e (III) a citação em livros, jornais, revistas ou qualquer outro meio de comunicação, de passagens de qualquer obra, para fins de estudo, crítica ou polêmica, na medida justificada para o fim a atingir, indicando-se o nome do autor e a origem da obra.

Assim sendo, para as condições informadas, desde que você faça as devidas referências do conteúdo utilizado, não há necessidade de autorização da editora.

Atenciosamente,

Arysinha Affonso
Bookman | Ciências Exatas, Sociais e Aplicadas
(51) 3027 7021 | (51) 91819621
Grupo A | www.grupoa.com.br
Porto Alegre | RS | Jerônimo de Ornelas, 670
twitter.com/bookmaneditora | facebook.com/Bookmaneditora

grupo a
Conhecimento que transforma.

ANEXO 3 – VARREDURA 900 A 400 nm NA CONCENTRAÇÃO 5% DE CARBONATO DE SÓDIO ANIDRO

	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
Tempo	λ pico Absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico Absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico Absorção Máxima	Absorbância Máxima
0	869	0,348	851	0,349	870	0,338
1	819	0,377	824	0,378	820	0,366
2	816	0,397	816	0,396	817	0,384
3	804	0,410	811	0,408	804	0,396
4	804	0,419	804	0,417	803	0,405
5	801	0,426	804	0,425	803	0,412
6	800	0,432	800	0,431	800	0,418
7	803	0,437	802	0,436	800	0,422
8	800	0,442	796	0,44	800	0,427
9	796	0,445	799	0,444	796	0,430
10	796	0,448	796	0,448	797	0,433
11	796	0,452	794	0,45	797	0,436
12	796	0,454	794	0,453	795	0,439
13	793	0,457	796	0,456	796	0,441
14	793	0,459	793	0,458	797	0,443
15	795	0,461	793	0,46	791	0,445
16	793	0,463	792	0,462	795	0,447
17	791	0,465	791	0,464	795	0,449
18	790	0,467	795	0,466	794	0,451
19	789	0,468	788	0,467	795	0,452
20	791	0,47	791	0,469	791	0,454
21	788	0,471	788	0,47	788	0,455
22	791	0,473	788	0,472	788	0,456
23	789	0,474	787	0,473	788	0,458
24	789	0,475	790	0,474	788	0,459
25	789	0,476	788	0,476	787	0,460
26	787	0,478	789	0,477	788	0,461
27	788	0,479	787	0,478	787	0,462
28	788	0,48	787	0,479	788	0,463
29	787	0,481	787	0,48	787	0,464
30	791	0,482	786	0,481	787	0,465
31	788	0,483	787	0,482	787	0,466
32	786	0,484	788	0,483	788	0,467
33	786	0,484	787	0,484	787	0,468
34	788	0,485	787	0,484	789	0,469
35	788	0,486	787	0,485	787	0,469
36	787	0,487	787	0,486	788	0,470
37	785	0,488	788	0,487	787	0,471
38	787	0,489	787	0,488	786	0,472
39	787	0,489	787	0,488	787	0,472
40	783	0,490	787	0,489	787	0,473

	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
Tempo	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico Absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico Absorção Máxima	Absorbância Máxima
0	811	0,418	811	0,418	811	0,406
1	799	0,451	796	0,450	796	0,431
2	799	0,466	795	0,466	795	0,445
3	795	0,477	796	0,477	796	0,445
4	795	0,484	796	0,484	796	0,46
5	794	0,490	789	0,491	788	0,465
6	790	0,495	787	0,495	787	0,469
7	791	0,501	787	0,500	787	0,473
8	788	0,503	783	0,503	783	0,476
9	791	0,506	785	0,506	785	0,479
10	787	0,509	784	0,509	784	0,481
11	790	0,510	783	0,511	783	0,483
12	788	0,511	784	0,513	784	0,485
13	788	0,515	783	0,515	783	0,487
14	787	0,517	785	0,517	785	0,489
15	788	0,518	783	0,518	783	0,49
16	787	0,520	781	0,521	781	0,492
17	787	0,521	778	0,521	778	0,493
18	787	0,523	782	0,523	782	0,494
19	785	0,524	783	0,524	783	0,495
20	786	0,525	779	0,525	779	0,496
21	786	0,526	778	0,526	778	0,497
22	782	0,527	782	0,527	782	0,498
23	783	0,528	778	0,528	778	0,499
24	786	0,529	784	0,529	784	0,499
25	782	0,531	777	0,530	777	0,5
26	787	0,531	778	0,531	778	0,501
27	787	0,531	783	0,531	783	0,501
28	781	0,532	778	0,532	778	0,501
29	782	0,532	778	0,532	778	0,502
30	781	0,533	777	0,533	777	0,502
31	782	0,533	777	0,533	777	0,502
32	781	0,534	778	0,534	778	0,503
33	782	0,535	778	0,535	778	0,503
34	786	0,535	778	0,535	778	0,503
35	778	0,535	778	0,535	778	0,503
36	782	0,536	778	0,536	778	0,503
37	782	0,536	779	0,536	779	0,503
38	786	0,537	777	0,537	778	0,503
39	778	0,537	777	0,537	777	0,503
40	782	0,538	776	0,537	777	0,503

ANEXO 3 – VARREDURA 900 A 400 nm NA CONCENTRAÇÃO 10,75% DE CARBONATO DE SÓDIO ANIDRO

10,75%	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
Tempo	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima
0	800	0,442	799	0,454	796	0,452
1	795	0,466	795	0,479	796	0,475
2	791	0,478	791	0,493	788	0,487
3	787	0,485	791	0,501	788	0,495
4	787	0,491	786	0,507	788	0,501
5	785	0,495	786	0,512	788	0,506
6	784	0,499	788	0,516	788	0,509
7	787	0,501	785	0,519	784	0,512
8	787	0,504	785	0,521	779	0,514
9	786	0,506	783	0,523	781	0,516
10	785	0,507	787	0,525	783	0,518
11	782	0,509	782	0,527	778	0,52
12	782	0,51	782	0,528	783	0,521
13	777	0,511	787	0,529	778	0,522
14	777	0,511	780	0,530	781	0,523
15	785	0,512	782	0,531	783	0,523
16	779	0,513	778	0,531	778	0,524
17	777	0,513	782	0,532	778	0,524
18	777	0,514	779	0,532	778	0,525
19	778	0,514	779	0,532	777	0,525
20	778	0,514	782	0,532	782	0,525
21	785	0,514	779	0,532	781	0,525
22	777	0,514	780	0,533	778	0,525
23	777	0,514	782	0,533	778	0,525
24	777	0,515	782	0,533	778	0,525
25	777	0,515	782	0,533	778	0,525
26	782	0,515	778	0,533	778	0,525
27	778	0,515	782	0,533	778	0,525
28	778	0,515	778	0,533	778	0,525
29	778	0,515	782	0,533	778	0,525
30	777	0,515	778	0,533	778	0,525
31	778	0,515	778	0,533	778	0,525
32	778	0,515	778	0,533	778	0,525
33	778	0,515	778	0,533	778	0,525
34	778	0,515	778	0,533	778	0,525
35	782	0,515	782	0,533	778	0,525
36	778	0,515	782	0,533	778	0,525
37	782	0,515	782	0,533	778	0,525
38	778	0,515	778	0,533	778	0,525
39	778	0,515	778	0,533	781	0,525
40	783	0,515	778	0,533	781	0,525

ANEXO 3 – VARREDURA 900 A 400 nm NA CONCENTRAÇÃO 14,06% DE CARBONATO DE SÓDIO ANIDRO

	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
Tempo	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima	λ pico absorção Máxima	Absorbância Máxima
0	796	0,482	792	0,487	794	0,514
1	787	0,501	788	0,506	785	0,535
2	786	0,512	788	0,516	783	0,546
3	782	0,518	782	0,523	782	0,546
4	781	0,523	783	0,528	778	0,558
5	787	0,526	782	0,531	783	0,561
6	778	0,529	782	0,533	778	0,563
7	787	0,53	783	0,535	778	0,565
8	780	0,531	779	0,536	778	0,566
9	782	0,532	777	0,537	778	0,566
10	777	0,532	782	0,537	777	0,566
11	778	0,533	782	0,538	782	0,566
12	780	0,533	779	0,538	777	0,567
13	778	0,533	776	0,538	776	0,567
14	778	0,533	779	0,538	778	0,567
15	779	0,533	783	0,538	778	0,567
16	782	0,533	783	0,538	778	0,567
17	779	0,533	783	0,538	778	0,567
18	783	0,534	783	0,538	778	0,567
19	779	0,534	783	0,538	778	0,567
20	779	0,534	776	0,538	778	0,567
21	779	0,534	783	0,538	778	0,567
22	778	0,534	779	0,538	778	0,567
23	779	0,534	779	0,538	778	0,567
24	779	0,534	779	0,538	778	0,567
25	787	0,534	779	0,538	778	0,567
26	779	0,534	779	0,538	778	0,567
27	779	0,534	782	0,538	778	0,567
28	779	0,534	782	0,537	778	0,567
29	779	0,534	779	0,537	778	0,567
30	779	0,534	782	0,537	778	0,567
31	786	0,534	782	0,537	777	0,567
32	787	0,534	782	0,537	777	0,567
33	779	0,533	782	0,537	782	0,566
34	782	0,533	782	0,537	777	0,566
35	783	0,533	782	0,537	777	0,566
36	782	0,533	777	0,537	782	0,566
37	779	0,533	781	0,537	778	0,566
38	782	0,533	782	0,537	777	0,566
39	782	0,533	780	0,537	778	0,566
40	790	0,533	779	0,536	778	0,566

ANEXO 4 – LEITURA A 780 nm PARA O PADRÃO PIROGALOL

Tempo (min)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
0	0,258	0,286	0,297
1	0,268	0,297	0,306
2	0,273	0,330	0,309
3	0,276	0,306	0,312
4	0,277	0,308	0,314
5	0,279	0,309	0,315
6	0,280	0,310	0,316
7	0,281	0,311	0,316
8	0,281	0,311	0,317
9	0,281	0,311	0,317
10	0,281	0,311	0,317
11	0,282	0,311	0,317
12	0,282	0,311	0,317
13	0,282	0,311	0,318
14	0,282	0,312	0,318
15	0,282	0,312	0,318
16	0,282	0,312	0,318
17	0,282	0,311	0,318
18	0,283	0,311	0,318
19	0,283	0,311	0,318
20	0,283	0,311	0,318
21	0,283	0,311	0,318
22	0,282	0,311	0,317
23	0,283	0,311	0,317
24	0,283	0,311	0,317
25	0,283	0,311	0,317
26	0,283	0,311	0,317
27	0,283	0,311	0,317
28	0,283	0,311	0,317
29	0,283	0,311	0,317
30	0,283	0,311	0,317
31	0,283	0,310	0,316
32	0,283	0,310	0,316
33	0,282	0,310	0,316
34	0,282	0,310	0,316
35	0,282	0,310	0,316
36	0,282	0,310	0,316
37	0,282	0,310	0,316
38	0,282	0,310	0,316
39	0,282	0,310	0,316
40	0,282	0,309	0,316

ANEXO 4 – LEITURA A 780 nm PARA O PADRÃO ÁCIDO TÂNICO

Tempo (min)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
0	0,220	0,219	0,226
1	0,229	0,228	0,235
2	0,233	0,232	0,24
3	0,235	0,235	0,242
4	0,237	0,237	0,244
5	0,238	0,237	0,245
6	0,238	0,238	0,245
7	0,239	0,238	0,245
8	0,239	0,239	0,245
9	0,239	0,239	0,245
10	0,239	0,239	0,245
11	0,239	0,239	0,246
12	0,239	0,239	0,246
13	0,239	0,239	0,246
14	0,240	0,239	0,247
15	0,240	0,239	0,247
16	0,240	0,239	0,247
17	0,240	0,239	0,247
18	0,240	0,239	0,246
19	0,240	0,239	0,246
20	0,240	0,239	0,246
21	0,240	0,239	0,246
22	0,240	0,239	0,245
23	0,240	0,239	0,245
24	0,240	0,239	0,245
25	0,240	0,239	0,245
26	0,240	0,239	0,245
27	0,240	0,239	0,245
28	0,240	0,240	0,245
29	0,240	0,240	0,245
30	0,240	0,240	0,245
31	0,239	0,240	0,245
32	0,239	0,240	0,244
33	0,239	0,240	0,244
34	0,239	0,240	0,244
35	0,239	0,240	0,244
36	0,239	0,240	0,244
37	0,239	0,240	0,244
38	0,239	0,240	0,244
39	0,239	0,240	0,244
40	0,239	0,239	0,244

ANEXO 4 – LEITURA A 780 nm PARA O PADRÃO CATEQUINA

Tempo (min)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
0	0,184	0,176	0,181
1	0,191	0,186	0,186
2	0,193	0,190	0,189
3	0,195	0,191	0,190
4	0,196	0,193	0,191
5	0,197	0,193	0,191
6	0,197	0,193	0,191
7	0,197	0,193	0,191
8	0,197	0,194	0,191
9	0,197	0,194	0,191
10	0,197	0,194	0,191
11	0,197	0,194	0,191
12	0,197	0,194	0,191
13	0,197	0,194	0,190
14	0,197	0,194	0,190
15	0,197	0,194	0,190
16	0,197	0,194	0,190
17	0,197	0,194	0,190
18	0,197	0,194	0,189
19	0,197	0,194	0,189
20	0,197	0,194	0,189
21	0,197	0,194	0,189
22	0,197	0,194	0,188
23	0,197	0,194	0,188
24	0,197	0,194	0,188
25	0,197	0,194	0,188
26	0,197	0,194	0,188
27	0,197	0,194	0,188
28	0,196	0,194	0,188
29	0,196	0,193	0,188
30	0,196	0,193	0,187
31	0,196	0,193	0,187
32	0,196	0,193	0,187
33	0,196	0,193	0,187
34	0,196	0,193	0,187
35	0,196	0,193	0,186
36	0,196	0,193	0,186
37	0,196	0,193	0,186
38	0,196	0,192	0,186
39	0,195	0,192	0,186
40	0,195	0,192	0,186

ANEXO 4 – LEITURA A 780 nm PARA O PADRÃO ÁCIDO GÁLICO

Tempo (min)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
0	0,283	0,281	0,241
1	0,292	0,291	0,250
2	0,296	0,297	0,255
3	0,299	0,301	0,258
4	0,302	0,303	0,260
5	0,303	0,305	0,261
6	0,304	0,306	0,262
7	0,304	0,307	0,262
8	0,305	0,307	0,263
9	0,305	0,308	0,263
10	0,305	0,309	0,263
11	0,306	0,309	0,263
12	0,305	0,309	0,263
13	0,305	0,309	0,263
14	0,305	0,309	0,263
15	0,305	0,309	0,263
16	0,305	0,309	0,263
17	0,305	0,309	0,263
18	0,305	0,309	0,263
19	0,305	0,309	0,263
20	0,305	0,309	0,263
21	0,305	0,309	0,263
22	0,305	0,309	0,263
23	0,305	0,309	0,263
24	0,305	0,309	0,263
25	0,305	0,309	0,263
26	0,305	0,309	0,263
27	0,305	0,310	0,262
28	0,305	0,310	0,262
29	0,305	0,310	0,262
30	0,305	0,310	0,262
31	0,305	0,310	0,262
32	0,304	0,310	0,262
33	0,304	0,310	0,262
34	0,304	0,310	0,262
35	0,304	0,310	0,262
36	0,304	0,310	0,262
37	0,304	0,310	0,262
38	0,304	0,310	0,262
39	0,304	0,310	0,262
40	0,304	0,310	0,261