

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM  
ÁCIDO ELÁGICO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**

**PAULO ISAAC DIAS ASSUNÇÃO**

**ANÁPOLIS – GO**

**2016**

**PAULO ISAAC DIAS ASSUNÇÃO**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM  
ÁCIDO ELÁGICO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula**

**ANÁPOLIS – GO**

**2016**

PAUTO ISAAC DIAS ASSUNÇÃO

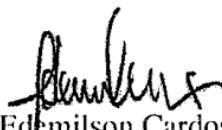
**"DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE EXTRATOS PADRONIZADOS  
EM ÁCIDO ELÁGICO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE)"**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 26 de fevereiro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
Prof. Dr. Joelma Abadia Marciano

Presidente da Banca

UEG/CET

  
Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição  
Membro Externo

UFG



Prof. Dr. Ivano Alejandro Devilla  
Membro Interno

UEG/ CET

Dedico este trabalho aos meus pais  
Edivaldo e Helâine e a minha noiva  
Maressa, que são as pessoas mais  
importantes na minha vida e meus  
melhores amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grato a Deus minha fortaleza em quem confio e sei que com Ele nunca estou sozinho. Obrigado por me capacitar, nunca me desemparar e por estar sempre me guiando segundo o conselho da Tua vontade que é boa, perfeita e agradável.

Gradeço aos meus pais pelo apoio, incentivo e por sempre estarem do meu lado. Essa é mais uma das muitas conquistas que ainda que espero ao longo desta jornada e em cada uma delas sempre ficará minha eterna gratidão por tudo que já me ensinaram.

À minha noiva pela paciência e compreensão ao longo não somente destes dois últimos anos, mas por ser companheira e minha melhor amiga neste caminho percorrido deste de o ensino médio.

À minha orientadora Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula por ter me concedido esta oportunidade incomparável de aprendizado profissional e pessoal, por ter acreditado mim e sempre me incentivado a ir além das minhas limitações. Não tenho palavras suficientes para lhe agradecer professora.

À Universidade Estadual de Goiás e a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Goiás (FAPEG) pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é popularmente conhecida como pitangueira. Segundo o uso popular, o chá das folhas apresenta aplicação como adstringente, antidiarreico, diurético, anti-reumático, antifebril, hipotensor, redutor do colesterol sanguíneo e controlador do ácido úrico na urina. Muitas de suas propriedades terapêuticas encontram-se validadas por pesquisas científicas. *E. uniflora*, por sua importância medicinal, integra a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde), enfatizando a necessidade de estudos e pesquisas que possam auxiliar no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos a partir dessa espécie vegetal. O presente estudo objetivou a produção de extratos secos por aspersão a partir das folhas de *E. uniflora*, com vistas à obtenção de produto intermediário para a produção de fitoterápicos e, também, à aquisição de parâmetros para o controle de qualidade. As folhas de *E. uniflora* foram obtidas na cidade de Anápolis-GO. Uma vez identificado, o material foi seco e pulverizado. Para a aquisição dos parâmetros de qualidade foi desenvolvida e validada metodologia por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para a avaliação de ácido elágico nos extratos. O extrato líquido foi obtido em pequena escala por extração assistida por ultrassom (EAU) e a técnica foi otimizada por meio de um planejamento Box Behnken ( $3^3$ ) para avaliação da concentração de ácido elágico em função dos parâmetros: grau alcoólico (%), p/p), tempo (minutos) e temperatura de extração (°C). O extrato líquido em maior escala foi obtido por percolação do material pulverizado utilizando solução etanólica a 44% (p/p). Foi realizada a otimização das condições de secagem por aspersão (*Spray drying*) do extrato líquido avaliando as variáveis independentes: temperatura do ar de entrada (°C), vazão do extrato (mL/min.) e concentração do adjuvante (%), p/p), frente as variáveis dependentes: rendimento da secagem (%), umidade (%), atividade de água e teor de ácido elágico (%), p/p) em um planejamento fatorial Box Behnken ( $3^3$ ). A metodologia desenvolvida mostrou-se adequada para a avaliação de ácido elágico nos extratos das folhas de *E. uniflora*. As melhores condições para EAU foram: grau alcoólico de 44% (p/p), tempo de extração de 22 minutos e temperatura de extração de 59°C. Nestas condições a concentração de ácido elágico obtida representou  $93,7\% \pm 0,4$  do valor predito pelo modelo. Os parâmetros de secagem com maiores valores de desejabilidade foram: temperatura de entrada de 144°C, vazão do extrato em 9 mL/min. e concentração de Aerosil® de 49% (p/p). Estas condições foram verificadas em triplicata e apresentaram respostas em concordância com os valores preditos pelo modelo. A avaliação morfológica dos extratos secos otimizados, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelou partículas irregulares de formato esférico e os diâmetros observados variaram entre 1,08 e 10,548 µm.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pitangueira. Ácido elágico. Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. Extrato seco. *Spray drying*.

## ABSTRACT

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is popularly known as Surinam cherry. According to popular usage, the tea leaves has application as an astringent, antidiarrheal, diuretic, antirheumatic, antipyretic, hypotensive, reducing blood cholesterol and controlling uric acid in the urine. Many of its therapeutic properties are validated by scientific researches. *E. uniflora*, for its medicinal importance, integrates RENISUS (National List of Medicinal Plants of Interest to the National Health System), highlighting the need for studies and research that could aid in the development of herbal medicines from this plant species. This study aimed at producing dry extracts by spraying from *E. uniflora* leaves, with a view to obtaining an intermediate for the production of herbal medicines and also to the acquisition parameters for quality control. The leaves of *E. uniflora* were obtained in the city of Anápolis-GO. Once identified, the material was dried and pulverized. For the acquisition of quality parameters was developed and validated a methodology for high-performance liquid chromatography (HPLC) for the evaluation of ellagic acid in the extracts. The liquid extract was obtained on a small scale by ultrasound assisted extraction (UAE) and the technique has been optimized using a Box Behnken design ( $3^3$ ) for: alcoholic degree (% w/w), time (minutes), and extraction temperature (°C) in the evaluation of ellagic acid concentration. The liquid extract on a larger scale was achieved by percolation of powdered material using ethanolic solution of 44% (w/w). The optimization of spray drying conditions evaluated the independent variables: inlet air temperature (°C), extract flow (mL/min.), and adjuvant concentration (% w/w), in function of the dependent variables: yield drying (%), moisture (%), water activity, and ellagic acid content (% w/w) in a Box Behnken factorial design ( $3^3$ ). The methodology developed was adequate for the evaluation of ellagic acid in the *E. uniflora* leaf extracts. The best conditions for UAE were: alcohol content of 44% (w/w), extraction time of 22 minutes, and extraction temperature of 59 °C. The content of ellagic acid was  $93.7\% \pm 0.4\%$  in relation to the predicted value. The drying parameters with higher desirability values were: inlet temperature of 144°C, extract flow rate of 9 mL/min., and Aerosil® concentration of 49% (w/w). These conditions were checked in triplicate and presented responses in agreement with the values predicted by the model. The morphological evaluation of dried extracts optimized by scanning electron microscopy (SEM) revealed irregular particles of spherical shape and the observed diameters ranged between 1.08 and 10.548 micrometers.

**KEYWORDS:** Surinam cherry. Ellagic acid. High-performance liquid chromatography. Dried extract. Spray drying.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | <i>Eugenia uniflora</i> L. (A), indivíduo adulto com a folha em detalhe, (B), Detalhe da flor; (C), Detalhe do fruto maduro.....  | 19 |
| <b>Figura 2:</b>  | Esquema da formação de ácido elágico a partir da hidrólise de elagitaninos isolados das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (eugeniflorina 1, eugeniflorina 2 e oenoteína B).....                    | 22 |
| <b>Figura 3:</b>  | Estrutura química das urolitinas A, B e isourolitina.....   | 23 |
| <b>Figura 4:</b>  | <i>Eugenia uniflora</i> L. em seu local de coleta na cidade de Anápolis, Goiás. A, aspecto geral da planta; B, detalhe do tronco da planta.....   | 40 |
| <b>Figura 5:</b>  | Folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. em vista frontal. A, face adaxial; B, face abaxial.....  | 51 |
| <b>Figura 6:</b>  | Secções paradérmicas da lâmina foliar de <i>Eugenia uniflora</i> L. em vista frontal. A, superfície adaxial; B e C, superfície abaxial.....   | 52 |
| <b>Figura 7:</b>  | Região de internervura das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. em secção transversal. A, detalhe do estômato em corte transversal; B, mesofilo dorsiventral; C, feixe vascular de menor calibre..... | 53 |
| <b>Figura 8:</b>  | Região do bordo das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. em secção transversal.....   | 54 |
| <b>Figura 9:</b>  | Região da nervura principal das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. em secção transversal.....   | 55 |
| <b>Figura 10:</b> | Região do pecíolo das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. em secção transversal. A, vista geral do pecíolo; B, detalhe da região cortical; C, detalhe do feixe vascular.....                         | 56 |
| <b>Figura 11:</b> | Distribuição granulométrica das partículas do pó das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....   | 57 |
| <b>Figura 12:</b> | Estrutura química dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 60 |
| <b>Figura 13:</b> | Cromatograma do perfil do extrato líquido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 62 |
| <b>Figura 14:</b> | Cromatogramas da solução padrão ácido elágico (A) e solução amostra do extrato líquido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (B) obtidos com a metodologia desenvolvida por CLAE.....              | 66 |
| <b>Figura 15:</b> | Aspecto do extrato líquido e cromatogramas obtidos com (A) e sem (B) EFS.....   | 67 |
| <b>Figura 16:</b> | Cromatogramas do diluente (A) e fase móvel (B).....   | 69 |
| <b>Figura 17:</b> | Curva padrão de ácido elágico para avaliação da linearidade.....  | 70 |
| <b>Figura 18:</b> | Curvas padrão de ácido elágico para determinação dos limites de detecção e quantificação.....   | 72 |
| <b>Figura 19:</b> | Curva padrão de ácido elágico para a quantificação desse marcador nas amostras do extrato líquido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. utilizadas no estudo de otimização da EAU.....             | 76 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 20:</b> Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 78  |
| <b>Figura 21:</b> Correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo para a concentração de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ).....   | 79  |
| <b>Figura 22:</b> Curva termogravimétrica do padrão de ácido elágico.....   | 81  |
| <b>Figura 23:</b> Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.....   | 86  |
| <b>Figura 24:</b> Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.....   | 87  |
| <b>Figura 25:</b> Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.....  | 88  |
| <b>Figura 26:</b> Gráficos de superfície de resposta representando o teor de ácido elágico (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.....  | 89  |
| <b>Figura 27:</b> Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos.....  | 90  |
| <b>Figura 28:</b> Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.....   | 93  |
| <b>Figura 29:</b> Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.....   | 94  |
| <b>Figura 30:</b> Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.....  | 96  |
| <b>Figura 31:</b> Gráficos de superfície de resposta representando o teor de ácido elágico (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.....  | 97  |
| <b>Figura 32:</b> Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos do segundo delineamento experimental.....   | 98  |
| <b>Figura 33:</b> Cromatogramas do diluente (A), fase móvel (B), aerosil (C) e solução amostra do extrato seco das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. (D).....  | 101 |
| <b>Figura 34:</b> Extrato seco das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A-D fotomicrografias da primeira replicata do extrato seco. E e F fotomicrografias da segunda replicata do extrato seco. G e H fotomicrografias da terceira replicata do extrato seco..... | 103 |

## LISTA DE TABELAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Tabela 1:</b>  | Principais compostos identificados nas folhas e frutos de <i>Eugenia uniflora</i> L.....   | 20 |
| <b>Tabela 2:</b>  | Condições cromatográficas avaliadas para o desenvolvimento da metodologia por CLAE-UV.....   | 36 |
| <b>Tabela 3:</b>  | Parâmetros da metodologia de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para avaliação de ácido elágico no extrato líquido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....                               | 37 |
| <b>Tabela 4:</b>  | Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização da extração assistida por ultrassom de ácido elágico das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L..... | 40 |
| <b>Tabela 5:</b>  | Parâmetros de secagem por aspersão (Spray drying) para avaliação de três diferentes condições referentes ao adjuvante de secagem.....  | 44 |
| <b>Tabela 6:</b>  | Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (Spray Drying) do extrato líquido obtido.....                 | 45 |
| <b>Tabela 7:</b>  | Variáveis independentes e seus níveis avaliados pelo segundo delineamento fatorial para otimização do processo de secagem por aspersão (Spray Drying) do extrato líquido obtido.....                         | 47 |
| <b>Tabela 8:</b>  | Classes de metabólicos secundários encontradas no pó das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 58 |
| <b>Tabela 9:</b>  | Composição do óleo essencial das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 60 |
| <b>Tabela 10:</b> | Padrões avaliados e seus respectivos tempos de retenção e áreas na solução amostra.....  | 63 |
| <b>Tabela 11:</b> | Parâmetros avaliados na adequabilidade do sistema.....   | 68 |
| <b>Tabela 12:</b> | Áreas dos picos de ácido elágico na solução padrão.....  | 71 |
| <b>Tabela 13:</b> | Áreas dos picos de ácido elágico nas soluções padrão utilizadas na construção das curvas padrão para a determinação dos limites de detecção e quantificação.....   | 72 |
| <b>Tabela 14:</b> | Dados do teste de precisão.....  | 73 |
| <b>Tabela 15:</b> | Recuperação do padrão de ácido elágico adicionado à amostra.....   | 74 |
| <b>Tabela 16:</b> | Dados da avaliação de robustez da metodologia.....   | 75 |
| <b>Tabela 17:</b> | Matriz experimental do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e concentração de ácido elágico para a EAU das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 76 |
| <b>Tabela 18:</b> | Sumário dos valores de p efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken ( $3^3$ ) na otimização da EAU.....                               | 77 |
| <b>Tabela 19:</b> | Parâmetros da EAU otimizados e valores preditos e real de ácido elágico.....   | 79 |
| <b>Tabela 20:</b> | Caracterização do extrato líquido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....   | 80 |
| <b>Tabela 21:</b> | Rendimento e caracterização do extrato obtido com o método de secagem do estudo preliminar para a avaliação de três concentrações do adjuvante (Aerosil®).....   | 83 |

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Tabela 22:</b> | Matriz experimental do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (Spray Drying).....                                  | 84  |
| <b>Tabela 23:</b> | Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no planejamento Box Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....                             | 85  |
| <b>Tabela 24:</b> | Matriz experimental do segundo planejamento fatorial no modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (Spray Drying)..... | 91  |
| <b>Tabela 25:</b> | Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no novo planejamento Box Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....                        | 92  |
| <b>Tabela 26:</b> | Valores preditos para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. por aspersão (Spray Drying).....   | 99  |
| <b>Tabela 27:</b> | Valores reais para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. por aspersão (Spray Drying).....  | 100 |
| <b>Tabela 28:</b> | Dados do teste de precisão para co-validação da metodologia analítica.....  | 102 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATG – Atividade Termogravimétrica  
ATP – Adenosina Trifosfato  
AW – Atividade de Água  
CG/EM – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DNA – Ácido desoxiribonucleico  
Desv.Pad – Desvio Padrão  
DPR – Desvio Padrão Relativo  
EAU – Extração Assistida por Ultrassom  
EFS – Extração em Fase Sólida  
HHDP – Ácido hexahidrocufenico  
ICH - *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*  
LD – Limite de Detecção  
LQ – Limite de Quantificação  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PVDF – Fluoreto de Polivinilo  
 $r$  – Coeficiente de correlação  
 $r^2$  – Coeficiente de determinação  
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada  
RE – Resolução  
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde  
TR – Tempo de retenção  
UEG – Universidade Estadual de Goiás  
UV – Ultravioleta  
WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | INTRODUÇÃO.....  | 16 |
| 2.       | OBJETIVOS.....   | 24 |
| 2.1.     | Objetivo geral.....  | 24 |
| 2.2.     | Objetivos específicos.....   | 24 |
| 3.       | METODOLOGIA.....   | 25 |
| 3.1.     | Descrição morfoanatômica das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....  | 25 |
| 3.1.1.   | Material Botânico.....   | 25 |
| 3.1.2.   | Descrição Macroscópica.....  | 25 |
| 3.1.3.   | Descrição Microscópica.....  | 25 |
| 3.2.     | Obtenção e processamento do material vegetal.....  | 26 |
| 3.3.     | Caracterização do Material Vegetal.....  | 26 |
| 3.3.1    | Ensaio de Pureza.....  | 26 |
| 3.3.1.1. | Determinação da perda por dessecação.....  | 26 |
| 3.3.1.2. | Determinação de Cinzas Totais.....   | 26 |
| 3.3.1.3. | Determinação da Cinzas Sulfatadas.....   | 27 |
| 3.3.2.   | Determinação da Distribuição Granulométrica.....   | 28 |
| 3.3.3.   | Determinação do Índice de Intumescência.....   | 28 |
| 3.3.4.   | Prospecção Fitoquímica.....  | 29 |
| 3.3.5.   | Caracterização do óleo essencial.....  | 29 |
| 3.3.5.1. | Extração de óleos essenciais.....  | 29 |
| 3.3.5.2. | Identificação dos constituintes do óleo essencial.....   | 29 |
| 3.3.6.   | Doseamentos.....   | 30 |
| 3.3.6.1. | Flavonoides totais.....  | 30 |
| 3.3.6.2. | Taninos totais.....  | 32 |
| 3.4.     | Desenvolvimento do Método Analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) .. | 33 |
| 3.4.1.   | Perfil cromatográfico das folhas de <i>E. uniflora</i> .....   | 33 |
| 3.4.2.   | Identificação de constituintes e seleção do marcador químico.....  | 34 |
| 3.4.3.   | Seleção do grau alcoólico da solução extratora.....  | 34 |
| 3.4.4.   | Preparo da amostra para o estudo de desenvolvimento do método analítico  | 35 |
| 3.4.5.   | Extração em Fase Sólida (EFS).....   | 35 |
| 3.4.6.   | Condições cromatográficas testadas.....  | 35 |
| 3.4.7.   | Determinação da proporção droga/solvente.....  | 36 |
| 3.5.     | Validação da Metodologia Analítica.....  | 37 |
| 3.5.1.   | Adequabilidade do Sistema.....   | 37 |
| 3.5.2.   | Especificidade.....  | 38 |
| 3.5.3.   | Linearidade.....   | 38 |
| 3.5.4.   | Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....  | 38 |
| 3.5.5.   | Precisão.....  | 39 |
| 3.5.6.   | Exatidão.....  | 39 |
| 3.5.7.   | Robustez.....  | 39 |
| 3.6.     | Obtenção e caracterização do extrato líquido a partir das folhas de <i>E. uniflora</i> .....   | 40 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 3.6.1.     | Otimização das condições de EAU para a obtenção de ácido elágico das folhas de <i>E. uniflora</i> ..... | 40 |
| 3.6.2.     | Obtenção do Extrato Líquido.....  | 42 |
| 3.6.3.     | Caracterização do extrato líquido.....  | 42 |
| 3.6.3.1.   | Determinação de Sólidos Totais.....   | 42 |
| 3.6.3.2.   | Determinação do pH.....   | 43 |
| 3.6.3.3.   | Determinação da densidade relativa.....   | 43 |
| 3.7.       | Obtenção e caracterização do extrato seco das folhas de <i>E. uniflora</i> .....                        | 43 |
| 3.7.1.     | Análise termogravimétrica (ATG) do padrão de ácido elágico.....   | 43 |
| 3.7.2.     | Delineamento experimental.....  | 44 |
| 3.7.3.     | Otimização da secagem dos extratos por aspersão ( <i>Spray Drying</i> ).....                            | 44 |
| 3.7.3.1.   | Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos.....   | 46 |
| 3.7.3.1.1. | Determinação do Rendimento de Secagem.....  | 46 |
| 3.7.3.1.2. | Determinação da Umidade.....  | 46 |
| 3.7.3.1.3. | Determinação da Atividade de Água (AW).....   | 46 |
| 3.7.3.1.4. | Determinação do teor de ácido elágico por CLAE.....   | 47 |
| 3.7.3.2.   | Segundo delineamento fatorial.....  | 47 |
| 3.7.3.3.   | Reprodução e caracterização dos extratos obtidos com as condições de secagem otimizadas.....            | 48 |
| 3.7.4.     | Co-validação da metodologia para quantificação de ácido elágico por CLAE.....                           | 48 |
| 3.7.5.     | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato seco das folhas de <i>E. uniflora</i> .....        | 49 |
| 4.         | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 50 |
| 4.1.       | Descrição morfoanatômica das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....                                   | 50 |
| 4.1.1.     | Descrição Macroscópica.....   | 50 |
| 4.1.2.     | Descrição Microscópica.....   | 51 |
| 4.2.       | Obtenção e processamento do material vegetal.....   | 56 |
| 4.3.       | Caracterização do Material Vegetal.....   | 56 |
| 4.3.1.     | Ensaios de pureza.....  | 56 |
| 4.3.2.     | Determinação da Distribuição Granulométrica.....  | 57 |
| 4.3.3.     | Determinação do Índice de Intumescência.....  | 57 |
| 4.3.4.     | Prospecção Fitoquímica.....   | 58 |
| 4.3.5.     | Caracterização do óleo essencial.....   | 59 |
| 4.3.6.     | Doseamento de Flavonoides e Taninos totais.....   | 61 |
| 4.4.       | Desenvolvimento do Método Analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por CLAE.....   | 62 |
| 4.4.1.     | Perfil cromatográfico das folhas de <i>E. uniflora</i> e seleção do marcador químico.....               | 62 |
| 4.4.2.     | Seleção do teor alcoólico da solução extratora.....   | 64 |
| 4.4.3.     | Condições Cromatográficas para CLAE.....  | 64 |
| 4.4.4.     | Extração em Fase Sólida (EFS).....  | 67 |
| 4.4.5.     | Determinação da proporção droga/solvente.....   | 68 |
| 4.5.       | Validação da Metodologia Analítica por CLAE.....  | 68 |
| 4.5.1.     | Adequabilidade do Sistema.....  | 68 |
| 4.5.2.     | Especificidade.....   | 68 |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 4.5.3.   | Linearidade.....  | 70  |
| 4.5.4.   | Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....   | 71  |
| 4.5.5.   | Precisão.....   | 73  |
| 4.5.6.   | Exatidão.....   | 73  |
| 4.5.7.   | Robustez.....   | 74  |
| 4.6.     | Obtenção e caracterização do extrato líquido a partir das folhas de <i>E. uniflora</i> .....            | 75  |
| 4.6.1.   | Otimização das condições de EAU para a obtenção de ácido elágico das folhas de <i>E. uniflora</i> ..... | 75  |
| 4.6.2.   | Obtenção do Extrato Líquido.....  | 80  |
| 4.6.3.   | Caracterização do extrato líquido.....  | 80  |
| 4.7.     | Obtenção e caracterização do extrato seco das folhas de <i>E. uniflora</i> .....                        | 81  |
| 4.7.1.   | Análise termogravimétrica (ATG) do padrão de ácido elágico.....   | 81  |
| 4.7.2.   | Delineamento experimental.....  | 82  |
| 4.7.3.   | Otimização da secagem dos extratos por aspersão ( <i>Spray Drying</i> ).....                            | 83  |
| 4.7.3.1. | Segundo delineamento fatorial.....  | 90  |
| 4.7.3.2. | Reprodução e caracterização dos extratos obtidos com as condições de secagem otimizadas.....            | 99  |
| 4.7.4.   | Co-validação da metodologia para quantificação de ácido elágico por CLAE.....                           | 100 |
| 4.7.5.   | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato seco das folhas de <i>E. uniflora</i> .....        | 102 |
| 5.       | CONCLUSÕES.....   | 105 |
|          | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 106 |

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são consideradas como fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas. Desde 1978 a Organização Mundial de Saúde (OMS) já recomendava aos países que utilizassem, além dos recursos disponíveis, os elementos da comunidade para o alcance da saúde (TOMAZZONI, NEGRELLE & CENTA, 2006; WHO, 1978). Na atualidade, mesmo após o advento da química sintética e da química combinatória, os produtos naturais persistem como importantes fontes de medicamentos em diversas culturas do mundo (WHO, 2002).

A resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) trata fitoterápicos em dois conceitos: medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico. Ambos são obtidos exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais. O medicamento fitoterápico deve apresentar segurança e eficácia comprovadas em evidências clínicas e caracterizados pela sua constância na qualidade. Por outro lado, o produto fitoterápico tradicional apresenta sua segurança e eficácia baseada em dados de uso publicados em literatura técnico-científica (BRASIL, 2014). Este conceito fortalece a contribuição cultural do uso tradicional de plantas pela população.

O Brasil se encontra na lista dos 17 países considerados megadiversos, e contém cerca de 13% de todas as espécies existentes no planeta (LEWINSOHN, 2006). Referindo-se exclusivamente a plantas superiores pode chegar a representar cerca de 22% das espécies existentes (CALIXTO, 2008). Entretanto, menos de 30% dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil são derivados de plantas nativas da América do Sul (CARVALHO et al., 2008).

Segundo Calixto (2008) há interesse por parte das indústrias nacionais em estabelecer parcerias com as universidades e centros de pesquisa objetivando o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Dentre as principais vantagens encontradas por estas empresas estão a comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade com menores investimentos. Todavia a falta de políticas de Estado de caráter duradouro e a descontinuidade de programas existentes dificultam o desenvolvimento de produtos originalmente nacionais.

Com o crescimento da utilização de produtos naturais em todo o mundo, a segurança e a qualidade destes produtos tem se tornado foco majoritário de interesse para as autoridades de saúde, indústrias farmacêuticas e a população (WHO, 2007). A fim de se obter produtos de fontes naturais com constância de qualidade, além de se utilizar técnicas sistematizadas de cultivo, faz-se necessária a obtenção adequada do extrato vegetal (SIMÕES et al., 2010).

A tecnologia envolvida na produção de extratos vegetais tem suscitado grande interesse nos últimos anos, com ênfase nos extratos secos. O principal objetivo da secagem é a retirada de água, o que proporciona uma maior estabilidade química, físico-química e microbiológica dos extratos (SOUZA, LIONZO & PETROVICK, 2006). A maior concentração de compostos ativos e a elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas e semissólidas, também são apontadas como vantagens deste processo tecnológico (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; VASCONCELOS et al., 2005).

Entre os procedimentos de secagem de extratos vegetais, destaca-se a técnica de secagem por aspersão ou atomização (*Spray Drying*) (LIST & SCHMIDT, 1989). Esta técnica envolve a formação de pequenas gotículas, pela atomização do extrato líquido, aumentando a superfície de contato com o fluxo quente do ar de secagem, levando a uma evaporação rápida do solvente (CORTÉS-ROJAS, SOUZA & OLIVEIRA, 2015). São vantagens da utilização desta técnica: a evaporação rápida, de tal maneira que as gotículas não chegam a atingir temperaturas elevadas; baixos custos de produção se comparados aos custos de outras técnicas de secagem; e os extratos podem ser facilmente manipulados, apesar de serem higroscópicos (MARQUES & VIGO, 2009).

A obtenção adequada do extrato vegetal, como um fator determinante na constância da qualidade de um produto de origem natural, deve ser monitorada durante todo o processo até a consolidação do produto final. Para tanto, frequentemente se utiliza, como referência, a substância ou o grupo de substâncias, diretamente relacionadas ou não com o efeito terapêutico da planta, que, segundo a RDC nº 26 da ANVISA recebem a denominação de marcador (BRASIL, 2014).

As plantas apresentam diversos constituintes, por consequência são frequentemente associadas a mais de um potencial terapêutico. O efeito terapêutico pode ser resultado de ações sinérgicas entre vários constituintes ativos (HOSTETTMANN et al., 2008). Além disso, pode ocorrer variação entre os constituintes afetando diretamente a qualidade do material vegetal e assim o seu efeito terapêutico. Desta forma é necessária a aquisição de parâmetros de qualidade, tais como, concentração de marcadores, propriedades organolépticas, distribuição granulométrica e morfologia das partículas, a fim destes serem mantidos durante o processo de obtenção de um medicamento fitoterápico (CALIXTO, 2000).

*Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira, é membro da família Myrtaceae. Essa família é composta por cerca de 142 gêneros e 5.500 espécies de plantas lenhosas, com distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália (SOUZA & LORENZI, 2005; THORNHILL et al., 2012).

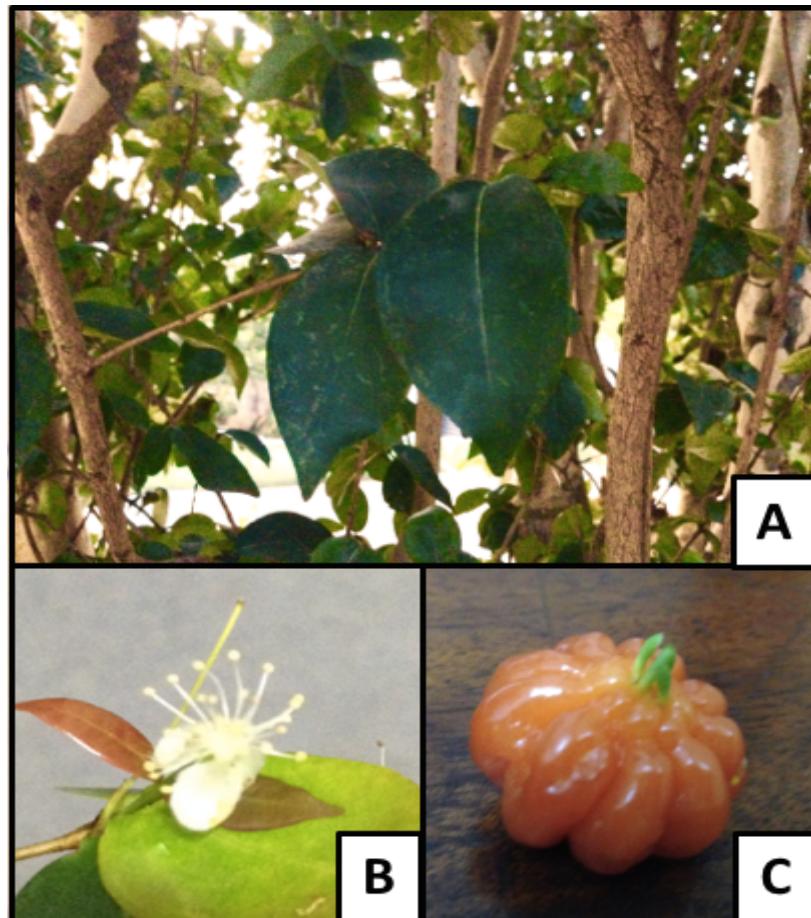
Segundo Lorenzi e Matos (2008), *E. uniflora* tem sido introduzida em outros continentes apesar de ser nativa do Brasil e com distribuição desde o planalto meridional até a restingas litorâneas do nordeste até o sul.

Várias espécies da família Myrtaceae apresentam valor econômico agregado, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp) utilizado na produção de madeira e aromatizantes e a *Psidium guajava* L., popularmente conhecida como goiabeira, cujos frutos são apreciados *in natura* e industrializados (CARVALHO JUNIOR et al., 2014).

No Brasil a pitangueira apresenta monografia descrita na Farmacopeia, e em 2009 a espécie, juntamente com outras 70 plantas, recebeu maior destaque por integrar a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), acentuando a necessidade de estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para o uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

A pitangueira é caracterizada por árvores frutíferas medindo de 4-10 m de altura. No Cerrado brasileiro pode ocorrer a espécie *Eugenia pitanga* O.Berg que apresenta porte arbustivo inferior a 1m de altura, porém as demais características morfológicas são idênticas a *Eugenia uniflora*. Seu fruto, do tipo drupa, pode conter uma ou duas sementes (Figura 1C). O Tronco é liso e de cor pardo-clara com folhas simples, cartáceas variando de 3 a 7 cm de comprimento, estas quando amassadas apresentam odor característico. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2 a 3 nas axilas e nas extremidades dos ramos (Figura 1B). Os rizomas tem propriedade de rebrotar sob a árvore, produzindo touceiras (LORENZI & MATOS, 2008). A lâmina foliar é glabra. O limbo mede de 2 a 7,5 cm de comprimento e 1 a 3,5 de largura (Figura 1A), as folhas são sub-sésseis, com os pecíolos medindo de 1 a 3 mm de comprimento (JORGE et al., 1994).

**Figura 1:** *Eugenia uniflora* L. (A), indivíduo adulto com a folha em detalhe; (B), Detalhe da flor; (C), Detalhe do fruto maduro.



Fonte: Próprio autor

Segundo a medicina popular, a infusão das folhas é utilizada como adstringente, antidiarreico, diurético, anti-reumático, antifebril, hipotensor, redutor do colesterol sanguíneo e controlador do ácido úrico na urina (ALICE et al., 1991; CONSOLINI et al., 1999; HENRIQUES, et al., 1993; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). O grupo de metabólito de interesse medicinal encontrado com maior frequência nas publicações sobre a espécie *E. uniflora* é o dos óleos essenciais. Entretanto muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo qualitativo ou quantitativo de outros constituintes das folhas e frutos desta espécie (Tabela 1).

**Tabela 1:** Principais compostos identificados nas folhas e frutos de *Eugenia uniflora* L.

| Classe         | Parte da Planta | Compostos Majoritários                                       | Referências                     |
|----------------|-----------------|--|---------------------------------|
| Óleo Essencial | Folhas          | furanodieno (24%)  |                                 |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-one (17%)                           | Wyerstahl et al., 1988          |
|                |                 | oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14%)                      |                                 |
|                |                 | germacreno B (5,8%)  |                                 |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-one (48,5%)                         | Morais et al., 1996             |
|                |                 | oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,3%)                    |                                 |
|                |                 | curzereno (19,7%)  |                                 |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-one (17,8%)                         | Ogunwnde et al., 2005           |
|                |                 | attractylone (16,9%)   |                                 |
|                |                 | furanodieno (9,6%)   |                                 |
| Fruto          | Folhas          | attractylone (26,8%)   |                                 |
|                |                 | curzereno (17,9%)  | Lago et al., 2011               |
|                |                 | germacreno B (9,31%)   |                                 |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-one (17,5%)                         | Martinez-Correa et al., 2011    |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-epíxido (23,5%)                     |                                 |
| Flavonóides    | Folhas          | germacreno-D (11,6%)   |                                 |
|                |                 | germacrone (27,5%)   |                                 |
|                |                 | selina-1,3,7(11)-trien-8-one (19,2%)                         | Ogunwnde et al., 2005           |
|                |                 | curzereno (11,3%)  |                                 |
|                |                 | oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (11,0%)                    |                                 |
|                | Fruto           | quercetina   | Rattmann et al., 2012           |
|                |                 | miracetina   |                                 |
|                |                 | mircitrina   |                                 |
|                |                 | miracetina 3-O-(4''-O-galloyl)- $\alpha$ -L-ramnopiranósideo | Samy et al., 2014               |
|                |                 | miracetina 3-O- $\beta$ -D-glucopiranósideo                  |                                 |
| Taninos        | Folhas          | delfinidina-3-glicosídeo                                     | Einbond et al., 2004            |
|                |                 | miracetina   | Hoffmann-Ribani &               |
|                |                 | quercetina   | Rodriguez-Amaya 2009            |
|                |                 | kaempferol   |                                 |
|                |                 | quercetina   | Celli, Pereira-Neto & Beta 2011 |
|                |                 | miracetina   |                                 |
|                |                 | cianidina  |                                 |
|                |                 | oenoteína  |                                 |
|                |                 | eugeniflorina D <sub>1</sub>                                 | Lee et al., 1997                |
|                |                 | eugeniflorina D <sub>2</sub>                                 |                                 |
| Folhas         | Folhas          | gallocatequina   |                                 |
|                |                 | oenoteína  |                                 |
|                |                 | eugeniflorina D <sub>1</sub>                                 | Lee et al., 2000                |
|                |                 | eugeniflorina D <sub>2</sub>                                 |                                 |
|                |                 | ácido elágico  | Oliveira et al., 2014           |

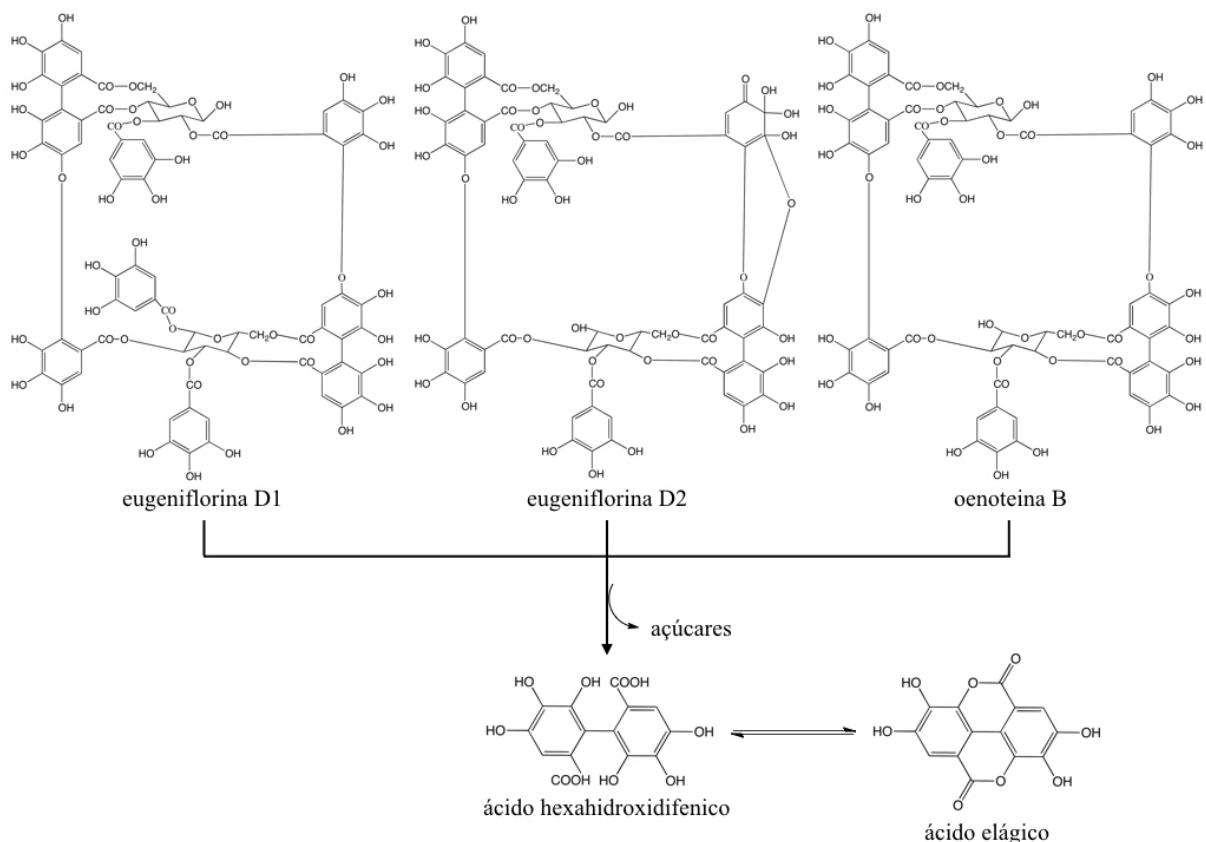
Em 1988 Wyerstahl et al. detalharam a composição do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* coletadas na região da Nigéria, no qual furanodieno (24%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14%) foram os constituintes majoritários. Schapoval et al. (1994) estudando infusos e decoctos obtidos a partir de folhas frescas de *E. uniflora* relataram seu efeito anti-inflamatório quando administrado por via oral em ratos. Consolini et al. (1999) demonstraram a atividade anti-hipertensiva do extrato aquoso das folhas em ratos normotensos. Arai et al. (1999) atribuíram atividade às frações do extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* sobre a hiperglicemia pós-prandial e hipertriglicerilemia, os resultados deste estudo apontaram como principal mecanismo para este efeito a inibição da decomposição de açúcar e gordura bem como a inibição da absorção de glicose.

Muitas das espécies do gênero *Eugenia* chamam a atenção pelo seu conteúdo de óleos essenciais e taninos (ROMAGNOLO & SOUZA, 2006). Nas folhas da espécie *E. uniflora* Lee et al. (1997) relataram pela primeira vez dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico, a eugeniflorina D<sub>1</sub> e eugeniflorina D<sub>2</sub> (Figura 2). Os autores também relataram a presença do elagitanino oenoteina B que por sua vez já apresentava estrutura química elucidada tendo sido isolada anteriormente em espécies do gênero *Oenothera* (YOSHIDA et al., 1991).

Lee et al. (2000) demonstraram a atividade antiviral dos compostos eugeniflorina D<sub>1</sub> e eugeniflorina D<sub>2</sub> isolados das folhas de *E. uniflora* pela inibição da enzima DNA polimerase presente no vírus Epsteinbarr, envolvido no desenvolvimento de tumores como nasofaríngeo. A oenoteina B tem demonstrado atividade sobre a inibição da proliferação de células humanas, impedindo a replicação do DNA. Tal atividade pode explicar sua indicação no tratamento de hiperplasias prostáticas (VITALONE et al., 2003).

De maneira geral os elagitaninos não são absorvidos de forma conjugada, sendo então metabolizados para a formação de outros compostos fenólicos. A partir da hidrólise de ligações éster dos elagitaninos, se tem a formação de unidades de ácido hexahidroxidifenico (HHDP), estas por sua vez, passam por um processo de lactonização espontânea levando a formação de ácido elágico (Figura 2) (CLIFFORD & SCALBERT, 2000; LANDETE, 2011). O ácido elágico é um composto fenólico, com baixa solubilidade em água, cuja presença já foi relatada anteriormente no plasma humano (SEERAM, LEE & HEBER 2004). Este composto é frequentemente associado a diversas atividades biológicas dentre as quais se destaca as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa por induzir o decaimento de ATP (adenosina trifosfato) intracelular (FESTA et al., 2001; LOSSO et al., 2004; SEERAM et al., 2005; ZANG, WANG & XU 2014).

**Figura 2:** Esquema da formação de ácido elágico a partir da hidrólise de elagitaninos isolados das folhas de *Eugenia uniflora* L. (eugeniflorina 1, eugeniflorina 2 e oenoteina B).



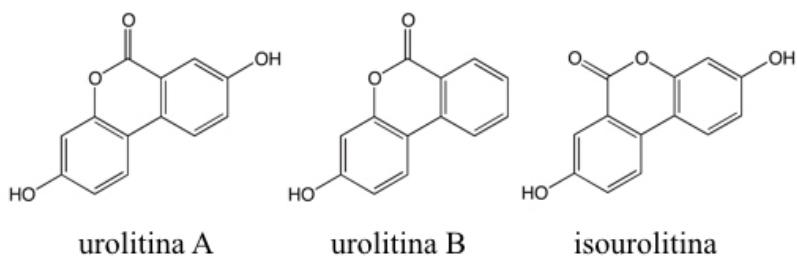
A atividade antioxidante do ácido elágico bem como dos elagitaninos é diretamente relacionada com o grau de hidroxilação destas moléculas, sendo assim, elagitaninos com menor peso molecular dispõem de uma menor capacidade antioxidante e o mesmo ocorre com o ácido elágico e seus derivados. A atividade antioxidante ainda pode ser comprometida em função do conteúdo de açúcares associados a estas moléculas (LANDETE, 2011; ZAFRILLA, FERRERES & TOMAS-BARBERAN, 2001).

Masamune et al. (2005) relataram o efeito anti-inflamatório do ácido elágico pela inibição de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em estudos *in vitro* com células estreladas pancreáticas. Umesalma e Sudhandian (2010) demonstraram em estudos com ratos portadores de câncer de colon o efeito inibitório do ácido elágico sobre o fator nuclear kappa beta (FN κβ) regulando a enzima óxido nítrico-sintetase induzível, (iNOS), a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e a interleucina 6 (IL-6).

As urolitinas (Figura 3) são moléculas derivadas do metabolismo de elagitaninos e ácido elágico pela microbiota intestinal. Estes compostos fenólicos são mais comumente encontrados biodisponíveis na circulação e já foram demonstrados seus efeitos anti-

inflamatório e antiproliferativo (ESPÍN et al., 2013). Tomás-Barberán et al. (2014) relataram que a urolitina A é o principal metabolito derivado do consumo de elagitaninos em humanos. O estudo ainda demonstrou que pode ocorrer variação no perfil destes metabólitos em diferentes indivíduos, levando a classificação destes em três fenótipos; fenótipo 0 (indivíduos que não produzirão urolitina), fenótipo A (indivíduos que produziram somente urolitina A) e fenótipo B (indivíduos que produziram urolitina A, isourolitina A e urolitina B).

**Figura 3:** Estrutura química das urolitinas A, B e isourolitina.



Vários métodos de análises químicas e bioquímicas têm sido empregados com o objetivo de determinar taninos e seus derivados em diferentes espécies vegetais (BELTRÁN-HEREDIA, SÁNCHEZ-MARTÍN & DÁVILA-ACEDO 2011; KISS et al., 2011; PENG, 2014; ZANG et al., 2010). Entretanto, o modo de preparação do material para avaliação destes compostos tem demonstrado potencial para maiores estudos e otimização das técnicas de obtenção (SIMÕES, 2010).

Até o presente momento não há registros na literatura sobre estudos que objetivaram o desenvolvimento tecnológico de extratos secos a partir das folhas de *E. uniflora*. Este fato ressalta a importância do presente estudo na obtenção de produto intermediário para a produção de fitoterápicos, na valorização de elementos da comunidade e utilização desta espécie como forma de tratamento ou prevenção de doenças.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1.Objetivo geral

Realizar o desenvolvimento tecnológico de extratos líquido e seco por aspersão a partir das folhas de *Eugenia uniflora* L., com vistas à obtenção de matéria-prima para a produção de fitoterápicos e, também, à aquisição de parâmetros para o controle de qualidade.

### 2.2.Objetivos específicos

- Realizar a descrição morfoanatômica das folhas de *E. uniflora* coletadas na cidade de Anápolis – GO.
- Caracterizar a matéria prima vegetal obtida das folhas de *E. uniflora*.
- Otimizar e padronizar métodos extractivos para obtenção de extrato etanólico líquido.
- Eleger os marcadores químicos que serão utilizados como referência para a aquisição de parâmetros de qualidade dos extratos.
- Desenvolver e validar método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para identificação e quantificação do marcador no extrato etanólico das folhas.
- Preparar os extratos secos por aspersão (*Spray drying*) a partir do extrato etanólico bruto, bem como realizar estudos de otimização do processo de secagem e a caracterização deste material.
- Realizar a co-validação da metodologia analítica desenvolvida por CLAE para avaliação do marcador no extrato seco das folhas de *E. uniflora*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Descrição morfoanatômica das folhas de *Eugenia uniflora* L.

As análises morfoanatômicas das folhas de *E. uniflora* foram realizadas no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

##### 3.1.1. Material Botânico

Para o estudo morfoanatômico o material botânico constituído de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) foi coletado no município de Anápolis, Goiás ( $16^{\circ} 17' 13,8''$  S e  $48^{\circ} 57' 22,7''$  O, altitude 1.074m) no período de julho a agosto de 2014. Foram utilizadas folhas adultas completamente expandidas, coletadas abaixo do terceiro nó. O material foi identificado pela Profa. Dra. Mirley Luciene dos Santos na Universidade Estadual de Goiás (UEG), e as exsicatas foram depositadas no herbário desta universidade, sob registro HUEG2090.

##### 3.1.2. Descrição Macroscópica

A caracterização macroscópica das folhas foi feita à vista desarmada e por meio de observação, segundo parâmetros descritos por Oliveira, Akisue, Akisue (2014) e Oliveira e Akisue (2000).

##### 3.1.3. Descrição Microscópica

Para o estudo anatômico das folhas, foram utilizados fragmentos de nervura principal, região de internervura, bordo e pecíolo. Para isso, as amostras foram fixadas em FPA [formaldeído a 37%, ácido propiônico e etanol a 70% na proporção de 1:1:18 - (V/V)] por um período de 24 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (V/V) (JOHANSEN, 1940 apud KRAUS & ARDUIN, 1997). Foram realizadas secções transversais à mão livre dos fragmentos fixados e cortes paradérmicos das faces adaxial e abaxial de folhas frescas. Os cortes foram submetidos ao processo de dupla coloração com azul de Alcian/safranina 9:1. As lâminas foram confeccionadas utilizando solução de glicerina 1:1 (BUKATSCH, 1972 apud

KRAUS & ARDUIN, 1997). Os registros fotográficos das estruturas anatômicas foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal de Goiás, em fotomicroscópio ZEISS AXIOSTAR plus, equipado com câmera digital Canon Power shot G10 de 14,7 megapixels.

### 3.2. Obtenção e processamento do material vegetal

Para a obtenção do material vegetal folhas de *E. uniflora* foram coletadas no mês de junho de 2014 no município de Anápolis, Goiás ( $16^{\circ} 17' 13,8''$  S e  $48^{\circ} 57' 22,7''$  O, 1.074m), durante o período da manhã. O material coletado foi dessecado em local ventilado, protegido da incidência direta de luz solar, em temperatura ambiente. Em seguida, o material dessecado foi triturado em moinho de facas. O pó obtido foi acondicionado em sacos plásticos, identificado e armazenado em local protegido da luz e umidade até sua utilização nos experimentos.

### 3.3. Caracterização do Material Vegetal

#### 3.3.1. Ensaios de Pureza

Os ensaios de pureza do material vegetal foram realizados no Laboratório de Pesquisa I (Enzimologia) da Universidade Estadual de Goiás.

##### 3.3.1.1. Determinação da perda por dessecação

Os ensaios foram realizados em triplicata conforme Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) utilizando balança com lâmpada de halogênio GIBERTINI modelo Eurotherm. Após a retirada de umidade do equipamento, foi pesado aproximadamente 1g do material botânico pulverizado, distribuídos de forma uniforme no prato da balança. O procedimento foi realizado durante 5 minutos a temperatura de 105°C.

##### 3.3.1.2. Determinação de Cinzas Totais

Para a determinação de cinzas totais, os ensaios foram realizados em triplicata conforme a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Pesou-se em balança analítica

(GEHAKA modelo AG2205) aproximadamente 3g da amostra pulverizada, os quais foram transferidos para um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. A amostra foi distribuída uniformemente e incinerada em mufla (QUIMIS modelo Q318924), aumentando a temperatura até cerca de 450°C e obtenção de cinzas brancas. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação a amostra seca conforme fórmula a seguir:

$$\% \text{ teor de cinzas} = \frac{N}{P_1} \times 100$$

Em que:

P<sub>1</sub> – peso inicial da amostra (g);

N – peso de cinzas totais da amostra (g).

### 3.3.1.3.Determinação das Cinzas Sulfatadas

Na determinação deste parâmetro de qualidade, os experimentos foram conduzidos em triplicata de acordo com descrição do teste na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Pesou-se em balança analítica aproximadamente 1g da amostra pulverizada, os quais foram transferidos para um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. Foi adicionado ao cadinho 1,0 mL de ácido sulfúrico P.A. O material foi então submetido a aquecimento em mufla (QUIMIS modelo Q318924) aumentando a temperatura gradativamente até cerca de 600°C, para a carbonização. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador e posteriormente foi adicionado 1,0 mL de ácido sulfúrico submetendo a amostra novamente ao aquecimento gradativo até 600°C. O material foi então resfriado e submetido novamente ao aquecimento por mais 30 minutos. A porcentagem de cinzas sulfatadas foi calculada conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ teor de cinzas sulfatadas} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_3} \times 100$$

Em que:

P<sub>1</sub> – peso do cadinho após a calcinação e resfriamento (g);

P<sub>2</sub> – peso do cadinho com a amostra após a calcinação e resfriamento (g);

$P_3$  – peso inicial da amostra (g).

### 3.3.2. Determinação da Distribuição Granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada em triplicata no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Goiás, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Foram utilizados os tamises de 150, 250, 425, 850 e 1000 µm dispostos de forma que os de maior abertura ficassem sobre os de menor e em fim sobre o receptor. Pesou-se aproximadamente 25g da amostra e transferiu-se para o tamis superior. A agitação foi desenvolvida por meio de dispositivo mecânico (BERTEL modelo 2156) durante 15 minutos. O cálculo do percentual retido em cada tamis foi realizado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

Em que:

$P_1$  – peso da amostra retida em cada tamis (g);

$P_2$  – soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g).

### 3.3.3. Determinação do Índice de Intumescência

A determinação deste parâmetro de qualidade foi realizada em triplicata no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010), avaliando dois solventes: água e etanol na concentração sugerida no estudo de otimização da técnica de extração assistida por ultrassom (EAU). Aproximadamente 1g da amostra pulverizada foi transferida para uma proveta de 25 mL com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. Adicionou-se o solvente até o limite de 25 mL, promoveram-se agitações na mistura a cada 10 minutos na primeira hora sendo posteriormente colocado em repouso pelo período de 3h, a temperatura ambiente. Após o repouso foi observado o volume ocupado pela amostra. O índice de intumescência foi obtido através do cálculo abaixo:

$$\text{Índice de intumescência} = V_f - V_i$$

Em que:

$V_f$  – Volume final ocupado pela amostra (mL);

$V_i$  – Volume inicial ocupado pela amostra (mL).

### 3.3.4. Prospecção Fitoquímica

Para a prospecção fitoquímica das folhas de *E. uniflora* foram realizadas reações de caracterização de compostos fenólicos (fenóis simples, cumarinas, flavonoides, antraquinonas, taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos), descritas e adaptadas de Costa (2001), Matos (2009), Matos & Matos (1989) e Simões et al. (2010). Para a reação de caracterização de saponinas, foram adaptadas as recomendações da Farmacopeia Brasileira V, volume 1 (BRASIL, 2010).

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

### 3.3.5. Caracterização do óleo essencial

#### 3.3.5.1.Extração de óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* foi realizada em triplicata, no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás, por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger. Foram utilizados cerca de 30g do material vegetal dessecado e pulverizado, sendo que o tempo de extração foi mantido em 2 horas. Ao final do processo o rendimento foi avaliado em volume do material oleoso coletado no aparato de Clevenger. O óleo essencial obtido em cada extração foi dessecado em sulfato de sódio anidro e armazenado sob atmosfera de N<sub>2</sub>, em frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechado, a temperatura de -20°C.

#### 3.3.5.2.Identificação dos constituintes do óleo essencial

O óleo essencial de cada uma das replicatas foi submetido a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em equipamento SHIMADZU QP5050A no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (CBP – 5; 30m x 0,25mm x 0,25µm), manteve-se uma vazão

de 1mL/min de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada de (60°C/2min; 3°C min<sup>-1</sup>/240°C; 10°C min<sup>-1</sup>/280°C 280°C/10min), e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1µL de cada uma das replicatas diluídas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na proporção de 1:5. Os componentes químicos dos óleos essenciais foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices aritméticos com a literatura (ADAMS, 2007). Foi realizada uma co-injeção de uma série de alkanos de 9 a 32 carbonos para utilização no cálculo do índice aritmético conforme a equação de Van der Dool e Kratz (1963) descrita abaixo:

$$AI = \frac{100 \times Pz + 100 (TRx - TRpz)}{TRpz1 - TRpz}$$

Em que:

AI = Índice Aritmético

Pz = Número de carbonos do alcano que eluiu antes do pico na amostra

TRx = Tempo de retenção do pico na amostra

TRpz = Tempo de retenção do pico do alcano que eluiu antes do pico da amostra

TRpz1= Tempo de retenção do pico do alcano que eluiu depois da amostra

### 3.3.6. Doseamentos

O preparo do material para os doseamentos de flavonoides e taninos totais foi realizado no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde e as leituras espcctofotométricas no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Estadual de Goiás.

#### 3.3.6.1.Flavonoides totais

O doseamento de flavonoides totais presentes no pó das folhas de *E. uniflora* foi realizado em triplicata conforme metodologia descrita na monografia da planta pela Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Foram pesados cerca de 0,4 g do material pulverizado e transferidos para balão de fundo redondo. Adicionou-se 1 mL da solução de metenamina a 0,5% (p/V) em água, 20 mL de cetona e 2 mL de ácido clorídrico. O balão foi aquecido em manta (FISATOM modelo 52)

sob refluxo durante 30 minutos. Com auxilio de algodão o material foi filtrado para um balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados ao balão de fundo redondo mais 20 mL de acetona e este foi submetido novamente ao aquecimento em manta sob refluxo durante mais 10 minutos e o material foi filtrado novamente para o mesmo balão volumétrico de 100 mL. Este processo foi repetido por mais uma vez. Apos o resfriamento do balão volumétrico, o menisco foi aferido completando o volume com acetona. 20 mL desta solução foram transferidos para funil de separação de 125 mL. Adicionou-se 20 mL de água e 15 mL de acetato de etila para a extração. A fração acetato de etila foi separada e o processo de extração foi repetido por mais três vezes utilizando 10 mL de acetato de etila em cada extração. Ao final no processo as fazes acetato de etila foram reunidas em um mesmo funil de separação e onde foi acrescentado 50 mL de água destilada. A fase acetato de etila foi então transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetato de etila.

A solução amostra foi obtida com 10 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL onde se acrescentou 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) em metanol e o volume do balão foi completado com solução metanolica de ácido acético 5% (v/v). A solução branco para o ajuste do zero no espectofotômetro foi obtida da mesma forma que a solução amostra entretanto sem a adição de 1 mL de cloreto de alumínio a 2% (p/V) ao blão de 25 mL.

Foi realizada a medição da absorvância da solução amostra a 425 nm em espectofotômetro PERKINELMER (modelo Lambda25) utilizando cubeta de 1 cm de espessura e a solução branco para o ajuste do zero. O teor de flavonoides totais foram expressos em quercetina de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Flavonóides totais \%} = \frac{\text{Abs} \times 62500}{500 \times m \times (100 - Pd)}$$

Em que:

Abs – absorvância da amostra

m – massa pesada do material pulverizado (g)

Pd – valor da perda por dessecção do material pulverizado (% p/p)

### 3.3.6.2.Taninos totais

O doseamento de taninos totais presentes no pó das folhas de *E. uniflora* foi realizado em triplicata conforme metodologia descrita na monografia da planta pela Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Foram pesados cerca de 0,75g do material pulverizado e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilada. Adicionou-se 150 mL de água destilada e o material foi submetido ao aquecimento em banho-maria durante 30 minutos a 60°C. Após resfriamento, o material foi transferido para balão volumétrico de 250 mL. Os resíduos presentes no erlenmeyer foram lavados com água e esta foi transferida para o mesmo balão volumétrico de 250 mL. O volume do balão foi completado com água destilada e deixado em repouso para decantação. O sobrenadante foi filtrado através de papel de filtro desprezando os primeiros 50 mL do filtrado.

A solução amostra para avaliação de polifenóis totais foi obtida pela diluição de 5 mL do filtrado em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Transferiu-se 2 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL. Foram acrescentados 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada para balão volumétrico. O volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/V).

A solução amostra para a avaliação de polifenóis não adsorvidos por pó de pele foi obtida transferindo 10 mL do filtrado para erlenmeyer de 125 mL onde foram adicionados 0,1g de pó de pele. Este material foi mantido sob agitação durante 60 minutos. Ao final do processo o conteúdo foi filtrado em papel de filtro. 5 mL deste filtrado foram diluídos em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Transferiu-se 2 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL, acrescentou-se 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico, 10 mL de água e o volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/V).

A solução padrão foi obtida com 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL em balão volumétrico com água destilada. Transferiu-se 5 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada. Por ultimo foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, 2mL desta solução, 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada. O volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/V).

As absorvâncias destas soluções foram determinadas em espectofotômetro PERKINELMER (modelo Lambda25) 30 minutos após seu preparo, Foi utilizando o

comprimento de onda de 760 nm e água destilada para o ajuste do zero. O teor de taninos adsorvidos no pó de pele foi determinado pela equação abaixo.

$$Taninos\ totais\ \% = \frac{62,5 \times (A1 - A2) \times m2}{A3 \times m1}$$

Em que:

A1 – absorbância da solução amostra para polifenóis totais

A2 – absorbância da solução amostra para polifenois não adsorvidos em pó de pele

A3 – absorbância da solução padrão

m1 – massa da amostra pulverizada (g)

m2 – massa de pirogalol (g)

### 3.4. Desenvolvimento do Método Analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE para este trabalho foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Estadual de Goiás.

#### 3.4.1. Perfil cromatográfico do extrato líquido das folhas de *E. uniflora*

Estudos prévios para avaliação do perfil cromatográfico das folhas de *E. uniflora* foram realizados a fim de se escolher o marcador químico. Para tanto, foram preparadas soluções extrativas em etanol a 70% (p/p) na proporção droga/solvente de 15% (p/V) assistidos em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod. USC-2800A, frequência 40kHz e potência 154W) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi homogeneizado, filtrado em papel de filtro e posteriormente em membrana de PVDF 0,45 µm para o vial apropriado.

O perfil cromatográfico foi desenvolvido em um sistema de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Varian® ProStar equipado com bomba ternária (modelo 240), injetor automático (modelo 310) e detector de UV (modelo 20599). Foi utilizada coluna C-18 Supelco® (250 x 4,6 mm, 5 µm). As condições cromatográficas para avaliação do perfil foram adaptadas do trabalho de Kim et al. (2013). Para tanto, foi utilizado como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas a 1% (V/V) com ácido acético obedecendo o

seguinte gradiente de eluição: 0 min. 2% fase B, 5 min 5% fase B, 12 min. 20% fase B, 15 min. 25% fase B, 18 min. 40% fase B, 25 min. 80% fase B, 28 min. 5% fase B e 30 min. 2% fase B. O fluxo foi mantido em 1,0 mL/min., o volume de injeção foi de 10,0 µL e os cromatogramas foram obtidos com o comprimento de onda de 280 nm.

### 3.4.2. Identificação de constituintes e seleção do marcador químico

A partir de dados bibliográficos sobre constituintes isolados no extrato líquido das folhas da espécie *E. uniflora* (Tabela 1) e dos estudos de prospecção fitoquímica, foi realizada uma seleção dos possíveis marcadores a serem avaliados no perfil cromatográfico do extrato.

Foram preparadas soluções volumétricas na concentração de 0,1 mg/mL com os padrões analíticos (Sigma®) ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, hesperidina, quercetina e rutina. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 µm e submetidas individualmente a CLAE utilizando a metodologia adaptada de Kim et al. (2013). Para cada solução foram realizadas três injeções cromatográficas.

A identificação dos constituintes presentes no extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção dos picos observados nos cromatogramas da amostra com os picos das soluções padrões. Dentre os compostos identificados o ácido elágico foi selecionado como marcador químico para o estudo de desenvolvimento da metodologia analítica.

### 3.4.3. Seleção do grau alcoólico da solução extratora

Para o estudo de desenvolvimento da metodologia analítica três graduações alcoólicas foram avaliadas: etanol a 50% (p/p), 70% (p/p) e a 90% (p/p). O preparo dos extratos foi realizado em triplicata para cada um dos solventes extratores obedecendo a proporção droga/solvente de 15% (p/V). O processo foi assistido em equipamento de ultrassom durante 30 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi homogeneizado, filtrado em papel de filtro e posteriormente em membrana de PVDF 0,45 µm para o vial apropriado.

A avaliação cromatográfica dos extratos foi conduzida utilizando a metodologia adaptada de Kim et al. (2013). A seleção da graduação alcoólica para o estudo de desenvolvimento levou em consideração a intensidade e a área do pico do marcador químico selecionado no item 3.4.2.

### 3.4.4. Preparo da amostra para o estudo de desenvolvimento do método analítico

Nessa etapa foram avaliadas diferentes condições cromatográficas a fim de se determinar qualitativamente e quantitativamente o marcador químico presente nos extratos das folhas de *E. uniflora*. Para isto a preparação do extrato foi conduzida com o solvente selecionado no item 3.4.3, obedecendo a proporção droga/solvente de 15% (p/V), em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod. USC-2800A) durante 30 minutos a temperatura ambiente com frequência e potência fixadas (40kHz e 154W respectivamente). Ao final do processo o extrato foi homogeneizado e filtrado em papel de filtro.

#### 3.4.5. Extração em fase sólida (EFS)

A EFS foi conduzida com o intuito de obter extratos mais purificados para a avaliação em CLAE. Este processo foi avaliado como uma etapa adicional ao preparo do extrato no estudo de desenvolvimento. Para tanto, foi utilizada a metodologia relatada no trabalho de Lopes et al. (2009). Uma alíquota de 1 mL do extrato filtrado foi transferida para um cartucho de EFS C-18 Supelco® com capacidade para 6 mL. A eluição foi realizada com fase móvel constituída de água e acetonitrila na proporção de 80:20 respectivamente. O extrato eluido foi coletado em balão volumétrico de 10 mL até atingir o volume do menisco. O conteúdo do balão foi filtrado em membrana de PVDF 0,45 µm para o vial apropriado. Esse material foi então submetido a CLAE a fim de determinar se houve interferência na avaliação do marcador.

#### 3.4.6. Condições cromatográficas testadas

Durante todo o estudo de desenvolvimento da metodologia analítica foi mantido constante o volume de injeção de 10 µL no injetor automático do sistema cromatográfico. Avaliou-se dois diferentes comprimentos de onda (245 e 280 nm), fases móveis constituídas de água/acetonitrila e água/metanol e cinco agentes acidificantes para a fase móvel em diferentes concentrações (ácido fórmico, ácido acético, ácido ortofosfórico, ácido tricloroacético e ácido trifluoracético). Também foram avaliados fluxos de 0,5 mL/min. até 1,2 mL/min. e métodos de eluições em gradiente e isocrático conforme apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Condições cromatográficas avaliadas para o desenvolvimento da metodologia por CLAE-UV.

| Sistema | Fase Móvel  | Eluição   | Fluxo<br>(mL/min.) | Comprimento<br>de onda (nm) | Referência               |
|---------|---|---|--------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1       | Água/acetonitrila<br>1% (v/v) ácido<br>acético            | 0 min. 2% B, 5 min<br>5% B, 12 min. 20%<br>B, 15 min. 25% B,<br>18 min. 40% B, 25<br>min. 80% B, 28<br>min. 5% B e 30<br>min. 2% B.         | 1                  | 280                         | Kim et al.,<br>2013      |
| 2       | Água/metanol<br>0,1% (v/v) ácido<br>fórmico               | 0 min. 10% B, 5<br>min 50% B, 15<br>min. 50% B, 20<br>min. 70% B, 30<br>min. 100% B, 35<br>min. 95% B, 40<br>min. 10% B e 45<br>min. 10% B. | 1                  | 254                         | Oliveira et<br>al., 2014 |
| 3       | Água/acetonitrila<br>0,05% (p/v) ácido<br>tricloroacético | 0 min. 125% B, 8<br>min 30% B, 15<br>min. 40% B, 18<br>min. 25% B e 20<br>min. 25% B.   | 1                  | 254                         | -                        |
| 4       | Água/acetonitrila<br>0,05% (p/v) ácido<br>tricloroacético | 85:15%  | 0.5-1.2            | 254                         | -                        |
| 5       | Água/acetonitrila<br>0,05% (p/v) ácido<br>ortofosfórico   | 85:15%  | 1                  | 245                         | -                        |
| 6       | Água/acetonitrila<br>0,05% (p/v) ácido<br>trifluoracético | 85:15%  | 1                  | 245                         | -                        |

### 3.4.7. Determinação da proporção droga/solvente

Foram realizados testes preliminares para determinação da proporção droga/solvente a fim desta variável ser mantida constante durante o desenvolvimento da metodologia analítica e nos experimentos de otimização da extração assistida por ultrassom. Para isso foram preparados extratos com uma quantidade fixa de massa do material pulverizado (1g) e três diferentes volumes de líquido extrator (etanol a 50% p/p); 6, 10 e 14 mL. O processo de extração foi assistido através de equipamento de ultrassom da marca Unique® (modelo USC-2800A, frequência de 40kHz e potencia de 154W) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Foram realizadas três preparações para cada um dos volumes de líquido extrator. Decorrido o tempo de extração o material foi filtrado em papel de filtro e posteriormente

filtrado para os seus respectivos *vials* em membrana de PVDF 0,45 $\mu\text{m}$ . A avaliação foi realizada em CLAE segundo metodologia desenvolvida com o intuito de se determinar em qual das proporções droga/solvente testadas haveria melhores parâmetros cromatográficos.

### 3.5. Validação da Metodologia Analítica

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo as orientações estabelecidas pelo ICH (*International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), a Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia de Orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registo e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico de junho de 2014 da ANVISA, para os testes de especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; BRASIL 2014; ICH 2005;). Os parâmetros cromatográficos validados, obtidos a partir dos estudos de desenvolvimento da metodologia analítica, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Parâmetros da metodologia de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para avaliação de ácido elágico no extrato líquido das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| Parâmetro             | Descrição  |
|-----------------------|--|
| Coluna Cromatográfica | C-18 250 x 4,6 mm 5 $\mu\text{m}$  |
| Fase móvel            | Água/Acetonitrila (85:15) acidificadas a 0,05% (p/V) com ácido tricloroacético |
| Comprimento de onda   | 254 nm   |
| Volume de injeção     | 10 $\mu\text{L}$   |
| Fluxo                 | 1,0 mL/minuto  |

#### 3.5.1. Adequabilidade do Sistema

A adequabilidade do sistema (*System Suitability*) foi avaliada por meio de seis injeções consecutivas de uma mesma solução amostra. Foram considerados os parâmetros de número de pratos teóricos, *K prime*, resolução, fator de calda (*taling*) e desvio padrão relativo (DPR) das áreas do pico de ácido elágico.

#### 3.5.2. Especificidade

A especificidade ou seletividade da metodologia foi avaliada pela comparação dos cromatogramas da solução branco (água:metanol 80:20 V/V), da fase móvel e da solução amostra, para a detecção de interferentes em uma co-eluição.

### 3.5.3. Linearidade

A linearidade da metodologia foi determinada por meio da curva padrão obtida das análises por CLAE das soluções padrões de ácido elágico. Foram preparadas três soluções volumétricas do padrão de ácido elágico em metanol grau CLAE para cada uma das cinco concentrações (14,5, 19,3, 24,2, 29,0 e 33,8 µg/mL). As soluções foram filtradas em membrana de PVDF 0,45 µm para os *vials* apropriados e submetidas a metodologia de CLAE. O coeficiente de correlação (*r*) e a equação da reta foram determinados por meio do cálculo de regressão linear.

### 3.5.4. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Preparou-se sete diferentes concentrações da solução padrão de ácido elágico (0,0064, 9,6, 12,8, 16,0, 19,2, 22,4, e 25,6 µg/mL) em metanol grau CLAE. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 µm e transferidas para os *vials* apropriados. Este procedimento foi realizado em triplicata de forma que ao final dos testes foram obtidas três curvas padrão.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir das três curvas padrão utilizando as fórmulas descritas abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Em que:

DP<sub>a</sub> – desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das três curvas padrão;

IC – média da inclinação das três curvas padrão.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Em que:

DP<sub>a</sub> – desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das três curvas padrão;

IC – média da inclinação das três curvas padrão.

### 3.5.5. Precisão

Foram preparados seis extratos a 10% (p/V) de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.4. As amostras foram filtradas em membrana de PVDF 0,45 µm para os *vials* apropriados. A análise em CLAE foi realizada com duas injeções de cada uma das seis preparações. A precisão da metodologia foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. O desvio padrão e o desvio padrão relativo foram avaliados intra-corrida e inter-corrida.

### 3.5.6. Exatidão

A exatidão da metodologia foi determinada pela capacidade de recuperação de quantidades conhecidas de ácido elágico. Foram preparadas soluções volumétricas em metanol grau CLAE do extrato líquido em três níveis de concentração, correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração do padrão no intervalo linear, com e sem a adição de quantidade conhecida do padrão ácido elágico (16,0 µg/mL), em triplicata. A exatidão foi calculada, para cada nível de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Recuperada} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Em que:

$C_1$  – concentração da amostra acrescida de padrão

$C_2$  – concentração da amostra sem adição de padrão

$C_3$  – concentração teórica do padrão

### 3.5.7. Robustez

A robustez da metodologia foi determinada para variações de fluxo (9 mL/min, 10 mL/min e 11 mL/min), volume de injeção (9 µL, 10 µL e 11 µL) e lote da coluna analítica (7727 e 8209). Para cada uma das condições foi preparada uma amostra conforme item 3.3.4. As amostras foram filtradas em membrana de PVDF de 0,45 µm e transferidas para seus

respectivos *vails*. Cada avaliação foi injetada em triplicata no sistema de CLAE e a análise dos dados foi realizada por meio dos cálculos de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

### 3.6. Obtenção e caracterização do extrato líquido a partir das folhas de *E. uniflora*

A obtenção dos extratos líquidos foi abordada em dois níveis: a) a produção do extrato em pequena escala, para a obtenção de parâmetros de controle de qualidade e realização de ensaios de otimização da EAU de ácido elágico; e b) produção do extrato em maior escala visando o desenvolvimento tecnológico de extratos secos. A identificação e quantificação de ácido elágico em ambos os casos foi realizada por CLAE, a partir do método analítico desenvolvido e validado anteriormente e o desenvolvimento destes extratos foram realizados no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde.

#### 3.6.1. Otimização das condições de EAU para a obtenção de ácido elágico das folhas de *E. uniflora*.

Na otimização da extração de ácido elágico assistida por ultrassom, em folhas de *E. uniflora*, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta em um modelo Box Behnken<sup>3</sup>. Com base em dados da literatura (ILBAY, SAHIN, KIRBASLAR, 2013; SAHIN, AYBASTIER, ISIK, 2013; WANG et al. 2013) foram selecionadas três variáveis independentes em três diferentes níveis conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4:** Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização da extração assistida por ultrassom de ácido elágico das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| <b>Variáveis Independentes</b> | <b>Níveis</b> |          |          |
|--------------------------------|---------------|----------|----------|
|                                | <b>-1</b>     | <b>0</b> | <b>1</b> |
| Teor alcoólico (% p/p)         | 40            | 60       | 80       |
| Temperatura de extração (°C)   | 30            | 45       | 60       |
| Tempo de extração (minutos)    | 20            | 30       | 40       |

Com auxílio do software Statistica® (versão 12.0) foi planejada a sequência aleatória das análises de acordo com o modelo estatístico, contendo 15 experimentos com três repetições do ponto central para a avaliação do erro puro.

A concentração de ácido elágico foi avaliada como variável dependente (resposta) para os 15 experimentos desenvolvidos. Para isso foi realizada em CLAE, segundo a metodologia validada anteriormente, uma curva de padrão com ácido elágico. Desta forma foram preparadas em triplicata, sete soluções volumétricas em metanol grau CLAE nas concentrações: 6,4, 9,6, 12,8, 16,0, 19,2, 22,4, e 25,6 µg/mL. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 µm e transferidas para os *vials* apropriados. A partir do cálculo de regressão linear foi obtida a equação da reta e o coeficiente de correlação entre os diferentes níveis.

Os resultados para cada um dos 15 experimentos foram enquadrados em uma equação polinomial de segundo grau pela técnica de múltipla regressão. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® (versão 12.0) e os coeficientes foram interpretados utilizando teste F. Três principais ferramentas utilizadas na análise de dados foram elas: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. Foram considerados efeitos significativos aqueles com valor de  $p < 0,05$ . A melhor condição de extração foi determinada de acordo com a equação definida pelo método dos mínimos quadrados:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 \\ + B_{23}X_2X_3$$

Em que:

$Y$  – resposta predita;

$B_0$  – constante do modelo;

$X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  – variáveis independentes;

$B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$  – coeficientes lineares;

$B_{12}$ ,  $B_{13}$  e  $B_{23}$  – coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

$B_{11}$ ,  $B_{22}$  e  $B_{33}$  – coeficientes quadráticos.

As condições consideradas ótimas para extração assistida por ultrassom de ácido elágico das folhas de *E. uniflora* foram validadas em triplicata avaliando a recuperação de ácido elágico em comparação com o valor predito pelo modelo.

### 3.6.2. Obtenção do Extrato Líquido

O extrato líquido das folhas de *E. uniflora* foi obtido por percolação. Resumidamente, cerca de 2 kg de material vegetal pulverizado foi deixado em maceração durante 24 horas em etanol na concentração sugerida no estudo de otimização da técnica de EAU e em seguida foram transferidos para percoladores de aço inox.

Após mais 24 horas de maceração nos percoladores, iniciou-se a percolação propriamente dita. O extrato coletado foi então rotulado e acondicionado sob refrigeração a -20 °C.

O extrato líquido obtido foi concentrado em rotaevaporador QUIMIS® (temperatura de 40°C a 70 rpm) até cerca de metade do volume inicial. Ao final do processo todo o volume do extrato concentrado foi homogeneizado e armazenado em frascos âmbar sob refrigeração (20°C).

### 3.6.3. Caracterização do extrato líquido

A caracterização do extrato líquido foi realizada por meio dos testes de determinação de sólidos totais, pH e densidade relativa, desenvolvidos no Laboratório de Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

#### 3.6.3.1. Determinação de Sólidos Totais

A determinação de sólidos totais do extrato líquido foi realizada em triplicata utilizando balança com lâmpada de halogênio SHIMADZU modelo UniBloc. Foram pesados aproximadamente 1g do extrato líquido obtido e durante 15 minutos foi mantida a temperatura de 105°C. A porcentagem de sólidos totais foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ sólidos totais} = 100 - U$$

Em que:

U – leitura da perda por dessecção indicada no display da balança para a amostra

### 3.6.3.2.Determinação do pH

A leitura do pH do extrato líquido foi realizada em triplicata pelo método potenciométrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Foi utilizado equipamento da marca MARCONI modelo MA-552 previamente calibrado com soluções tampões pH 7,0 e 4,0.

### 3.6.3.3.Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato líquido foi determinada de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) por metodologia gravimétrica. Utilizou-se três picnômetros com capacidade para 5 mL, limpos, secos e previamente calibrados e pesados. A densidade relativa foi determinada através da razão entre a massa da amostra e a massa da água purificada, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Densidade Relativa} = \frac{(P_e - P_v)}{(P_a - P_v)}$$

Em que:

P<sub>e</sub> – massa do picnômetro com o extrato líquido

P<sub>v</sub> – massa do picnômetro vazio

P<sub>a</sub> – massa do picnômetro com água purificada

## 3.7.Obtenção e caracterização do extrato seco das folhas de *E. uniflora*

O processo de secagem do extrato líquido foi realizado no Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Goiás, em equipamento do tipo “mini” *Spray Dryer* (LABMAQ® - modelo LM-MSD 1.0), com fluxo co-corrente.

### 3.7.1. Análise termogravimétrica (ATG) do padrão de ácido elágico

A análise termogravimétrica foi utilizada na avaliação do comportamento do ácido elágico frente a temperatura. Os dados obtidos poderiam influenciar nas condições de secagem do extrato de forma a se preservar a molécula do marcador. Para isso, cerca de 10mg do padrão Sigma® de ácido elágico (pureza > 95%) foram submetidos ao equipamento de análise termogravimétrica (PERKIN ELMER modelo Pyris 1 TGA). Foram utilizadas as

seguintes condições de análise: razão de aquecimento de 10°C/min., intervalo de 50 a 900°C, atmosfera de nitrogênio e vazão média de 20 mL/min. Este teste foi conduzido no Laboratório de Análises Instrumentais da Universidade Estadual de Goiás.

### 3.7.2. Delineamento experimental

A fim de se determinar variáveis independentes para a otimização do processo de secagem por aspersão (*Spray drying*) foi realizado um levantamento bibliográfico, tendo como descritores: *Spray drying*, *Dry Extract*, *Box Behnken*, *Optimisation*, *Ellagic acid*, *Eugenia uniflora*, *Myrtaceae* e *Response Surface Methodology*.

A partir dos dados obtidos, foram realizados três experimentos de secagem no *Spray Dryer* avaliando três diferentes condições em relação à concentração de adjuvante (dióxido de silício coloidal-Aerosil®): sem adição de adjuvante ao extrato líquido; 5% (p/p) de adjuvante em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido; e 20% (p/p) de adjuvante em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido. Os parâmetros de secagem utilizados encontram-se descritos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Parâmetros de secagem por aspersão (*Spray drying*) para avaliação de três diferentes condições referentes ao adjuvante de secagem.

| Parâmetro                    | Unidade                  |
|------------------------------|--------------------------|
| Diâmetro do bico de aspersão | 1,2 mm                   |
| Fluxo do ar comprimido       | 40 L/min.                |
| Pressão do ar comprimido     | 4,0 Kg/F                 |
| Fluxo do ar de secagem       | 3,0 m <sup>3</sup> /min. |
| Temperatura de entrada       | 125°C                    |
| Vazão do extrato             | 4,0 mL/min.              |

### 3.7.3. Otimização da secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*)

Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta em um modelo Box Behnken ( $3^3$ ), na otimização da secagem do extrato líquido obtido das folhas de *E. uniflora* pela técnica de aspersão (*Spray Drying*). Foram selecionadas, com base na literatura e nos experimentos realizados no item 3.7.2, três variáveis independentes em três diferentes níveis conforme descrito na Tabela 6.

**Tabela 6:** Variáveis independentes e seus níveis avaliados pela metodologia de superfície de resposta para otimização do processo de secagem por aspersão (*Spray Drying*) do extrato líquido obtido.

| Variáveis Independentes            | Níveis |     |     |
|------------------------------------|--------|-----|-----|
|                                    | -1     | 0   | 1   |
| Concentração de adjuvante (% p/p)* | 0      | 10  | 20  |
| Temperatura de entrada (°C)        | 120    | 140 | 160 |
| Vazão do extrato (mL/min.)         | 3      | 4   | 5   |

**Legenda:** \* porcentagem em relação a massa de sólidos totais.

A sequência aleatória das análises foi planejada utilizando o software Statistica® (versão 12.0). Delineou-se 15 experimentos com três repetições do ponto central para a avaliação do erro puro.

Os resultados dos 15 experimentos foram expressos nas seguintes variáveis dependentes: rendimento da secagem (%), teor de umidade (%), m/m), atividade de água (AW) e teor de ácido elágico (%), m/m), de acordo com o item 3.6.3.1. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® (versão 12.0) e os coeficientes foram interpretados utilizando teste F. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta para o tratamento dos dados, sendo considerados efeitos significativos aqueles com valor de  $p < 0,05$ . A melhor condição de extração foi determinada de acordo com a equação definida pelo método dos mínimos quadrados:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Em que:

$Y$  – resposta predita;

$B_0$  – constante do modelo;

$X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  – variáveis independentes;

$B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$  – coeficientes lineares;

$B_{12}$ ,  $B_{13}$  e  $B_{23}$  – coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

$B_{11}$ ,  $B_{22}$  e  $B_{33}$  – coeficientes quadráticos.

### 3.7.3.1. Rendimento e caracterização dos extratos secos obtidos

A avaliação do rendimento e os testes de caracterização dos extratos secos foram desenvolvidos nos laboratórios de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais e Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde, respectivamente.

#### 3.7.3.1.1. Determinação do Rendimento de Secagem

Para a determinação do rendimento foi realizada a pesagem do frasco coletor, anexado ao *Spray Dryer*, antes (frasco vazio) e após o processo de secagem (frasco contendo o extrato seco) bem como a quantidade em gramas de extrato líquido utilizado para a secagem. Calculou-se o rendimento de secagem em relação a porcentagem de sólidos totais presentes no extrato líquido, pela equação abaixo:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{P_2 - P_1}{S_t \times P_{EL}} \times 10000$$

Em que:

$P_1$  – peso do frasco coletor vazio (g)

$P_2$  – peso do frasco coletor contendo o extrato seco (g)

$S_t$  – massa de sólidos totais (incluindo a quantidade acrescida de adjuvante) presentes na amostra (g)

$P_{EL}$  – massa do extrato líquido submetido ao processo de secagem (g)

#### 3.7.3.1.2. Determinação da Umidade

A determinação do teor de umidade do extrato seco foi realizada em triplicata utilizando balança com lâmpada de halogênio SHIMADZU modelo UniBloc. Foram pesados aproximadamente 500mg do extrato seco obtido e durante 5 minutos foi mantida a temperatura de 105°C.

#### 3.7.3.1.3. Determinação da Atividade de Água (AW)

A atividade de água foi determinada em triplicata no equipamento PRE AQUA LAB modelo 450 com aproximadamente 250 mg do extrato seco obtido.

### 3.7.3.1.4. Determinação do teor de ácido elágico por CLAE

Para avaliação do teor de ácido elágico, foram pesados analiticamente 200mg do extrato seco obtido e transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se cerca de 5 mL de metanol (grau CLAE) e levou-se o balão ao banho de ultrassom durante 30 minutos a temperatura ambiente. O volume do balão foi completado com metanol (grau CLAE) e a solução foi filtrada em papel de filtro. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi submetida a extração em fase sólida conforme item 3.4.5. Procedeu-se os testes cromatográficos em CLAE de acordo com a metodologia co-validada no item 3.7.4.

$$\text{Teor de ácido elágico (\%)} = \left( \frac{\left( \frac{(AE \times 10.000)}{(Ad - 100)} \right)}{Mes} \right) \times 100$$

Em que:

AE – concentração de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ )

Ad – concentração de adjuvante presente no extrato líquido (% p/p)

Mes – massa pesada de extrato seco para avaliação em CLAE (mg)

### 3.7.3.2. Segundo delineamento fatorial

A fim de se explorar níveis mais abrangentes para as variáveis independentes selecionadas, foi desenvolvido um novo experimento no modelo Box Behnken  $3^3$  conforme descrito na Tabela 7.

**Tabela 7:** Variáveis independentes e seus níveis avaliados pelo segundo delineamento fatorial para otimização do processo de secagem por aspersão (*Spray Drying*) do extrato líquido obtido.

| Variáveis Independentes            | Níveis |     |     |
|------------------------------------|--------|-----|-----|
|                                    | -1     | 0   | 1   |
| Concentração de adjuvante (% p/p)* | 0      | 30  | 60  |
| Temperatura de entrada (°C)        | 120    | 150 | 180 |
| Vazão do extrato (mL/min.)         | 3      | 6   | 9   |

**Legenda:** \* porcentagem em relação a massa de sólidos totais.

A sequência aleatória das análises foi obtida pelo software Statistica® (versão 12.0) e os resultados dos 15 experimentos foram expressos nas seguintes variáveis dependentes: rendimento da secagem, umidade, atividade de água (WA) e teor de ácido elágico, de acordo com o item 3.7.3.1. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® (versão 12.0) e os coeficientes foram interpretados utilizando teste F. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta para o tratamento dos dados, sendo considerados efeitos significativos aqueles com valor de  $p < 0,05$ . A melhor condição de extração foi determinada de acordo com a equação definida pelo método dos mínimos quadrados:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Em que:

$Y$  – resposta predita;

$B_0$  – constante do modelo;

$X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  – variáveis independentes;

$B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$  – coeficientes lineares;

$B_{12}$ ,  $B_{13}$  e  $B_{23}$  – coeficientes de interação entre as variáveis independentes;

$B_{11}$ ,  $B_{22}$  e  $B_{33}$  – coeficientes quadráticos.

### 3.7.3.3. Reprodução e caracterização dos extratos obtidos com as condições de secagem otimizadas.

Os valores otimizados para as variáveis independentes avaliadas, com função de desejabilidade mais próxima de 1, foram testados em uma triplicada do processo de secagem e avaliados quanto ao rendimento, teor de umidade, atividade de água e teor de ácido elágico. Os valores observados foram comparados com os valores preditos do experimento da análise multifatorial para avaliar a eficiência do processo de otimização.

### 3.7.4. Co-validação da metodologia para quantificação de ácido elágico por CLAE

Foi determinada a eficácia da metodologia, já validada, para a avaliação do extrato líquido na quantificação de ácido elágico presente no extrato seco das folhas de *E. uniflora*. A

co-validação foi determinada pelos testes de especificidade e precisão/repetibilidade conforme os itens 3.5.2 e 3.5.5 respectivamente.

### 3.7.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato seco das folhas de *E. uniflora*.

A caracterização morfológica partículas dos extratos secos otimizados foi realizada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Multusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás. Para tanto os materiais foram afixados em fita adesiva metálica condutora de carbono e recobertos por uma fina camada de ouro em aparelho sputter (Denton Vacuum – Desk V). As observações foram realizadas em aparelho Jeol, JSM – 6610, equipado com espectroscópio de energia dispersiva (EDS), Thermo scientific NSS Spectral Imaging. As capturas das imagens foram realizadas com aumento de 600, 1000, 3000 e 5000 vezes. O tamanho médio das partículas foi calculado com o auxílio do software Olympus Scandium®.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Descrição morfoanatômica das folhas de *Eugenia uniflora* L.

#### 4.1.1. Descrição Macroscópica

O espécime é uma arvoreta com aproximadamente 4 metros de altura (Figura 4A), tronco liso e cilíndrico cinza amarelado (Figura 4B), com folhas simples e opostas. Durante o período de coleta das folhas, não foi possível observar flores ou frutos. De acordo com Lorenzi e Matos (2008), a espécie *E. uniflora* é arbustiva ou árvore semidecídua, variando entre 4 e 10 m de altura. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2 a 3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os rizomas tem propriedade de rebrotar sob a árvore, produzindo touceiras (LORENZI & MATOS, 2008).

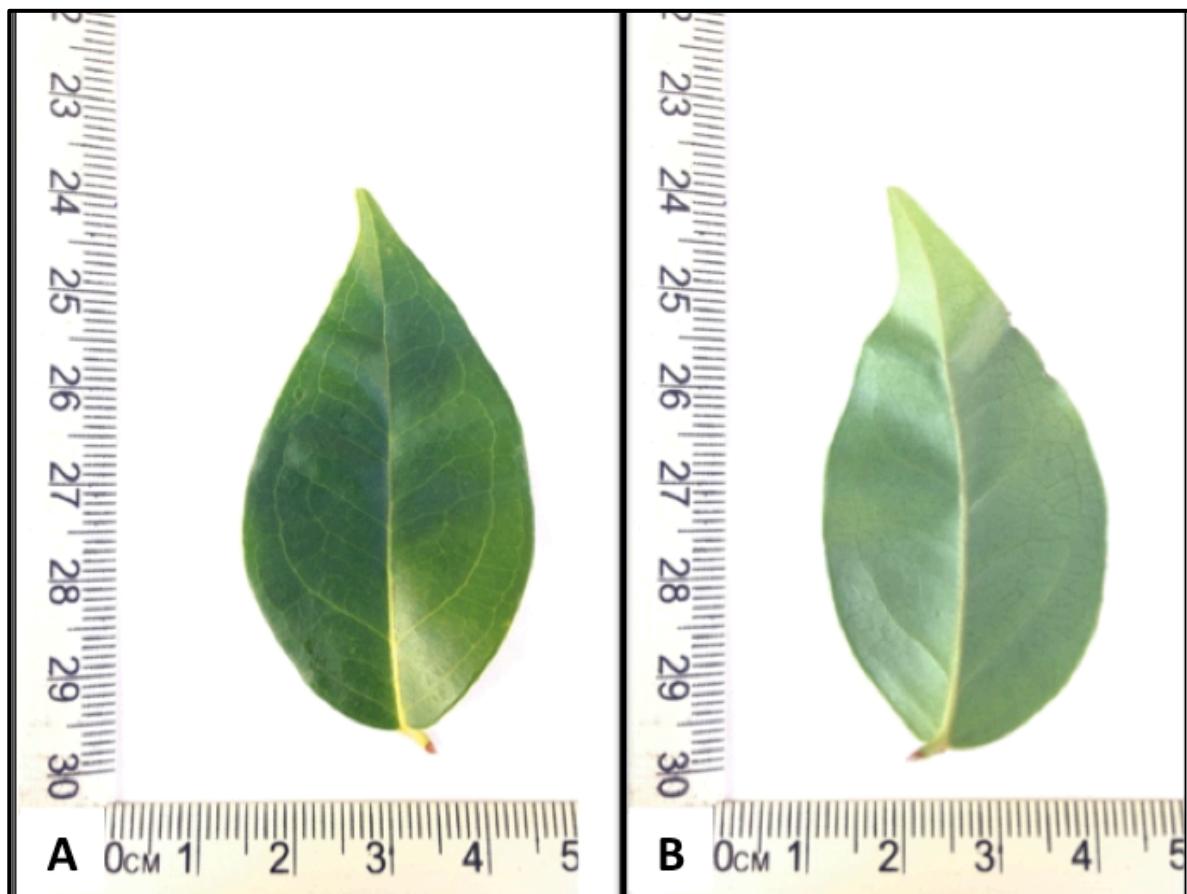
**Figura 4:** *Eugenia uniflora* L. em seu local de coleta na cidade de Anápolis, Goiás. A, aspecto geral da planta; B, detalhe do tronco da planta.



As folhas apresentam entre 2 a 4 cm de largura e cerca de 4 a 7 cm de comprimento (Figura 5). O contorno foliar é lanceolado e ovado, base obtusa, são curtamente pecioladas, o pecíolo é achatado (aproximadamente 0,1 a 0,2 cm). O ápice foliar é acuminado e alguns são cuspidados, a margem é inteira e levemente sinuosa. A superfície foliar é glabra e a nervura principal é proeminente na face abaxial. Esses dados estão em conformidade com outros

estudos (ALVES, TRESMONDI & LONGUI, 2008; DIAS et al, 2012; JORGE et al, 1994; LORENZI & MATOS, 2008). Alves, Tresmondi e Longui (2008) demonstraram que pode ocorrer variação no tamanho do limbo foliar de *E. uniflora*, em função do ambiente de coleta (urbano ou rural) levando em conta a poluição como fator de interferência no desenvolvimento do vegetal.

**Figura 5:** Folhas de *Eugenia uniflora* L. em vista frontal. A, face adaxial; B, face abaxial.

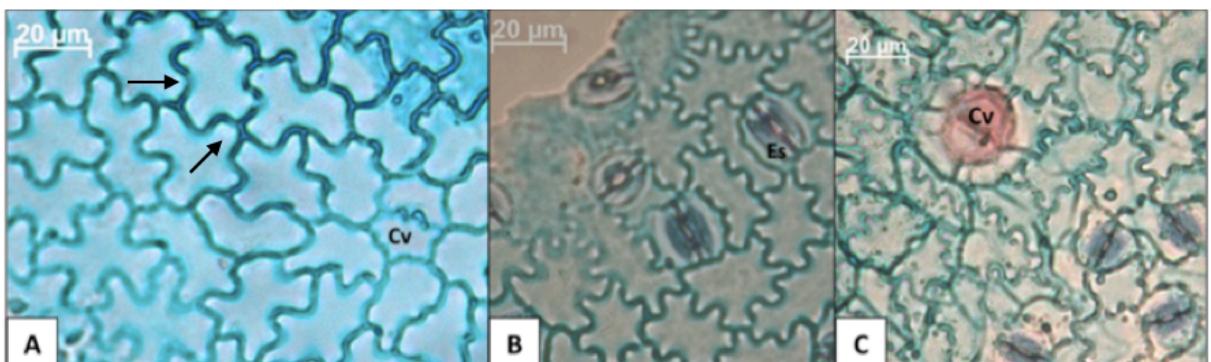


#### 4.1.2. Descrição Microscópica

Em vista frontal, a epiderme de ambas as faces apresenta células de dimensões variadas (Figura 6) com paredes anticlinais levemente espessadas. Em ambas as faces, é possível observar a sinuosidade das paredes celulares, entretanto, isso se torna mais evidente na superfície abaxial. Foram evidenciados pares de células que acompanham as estruturas secretoras, estas, por sua vez, apresentam conteúdo típico para cada espécie pertencente à família Myrtaceae, sendo constituído por óleo essencial (DONATO & MORRETES, 2007). Somente na face abaxial (Figura 6 B e C) foram evidenciados estômatos paracíticos (folhas

hipoestomáticas), esta característica é considerada comum para as plantas terrestres onde a temperatura é mais elevada na face abaxial (BOEGER & WISNIEWSKI, 2003). Não foram evidenciados tricomas em ambas as faces da lâmina foliar. A ausência de tricomas já foi apontada anteriormente como um fator de diagnóstico na espécie *E. uniflora* (LORCA, AMAT & GONZÁLES, 1995).

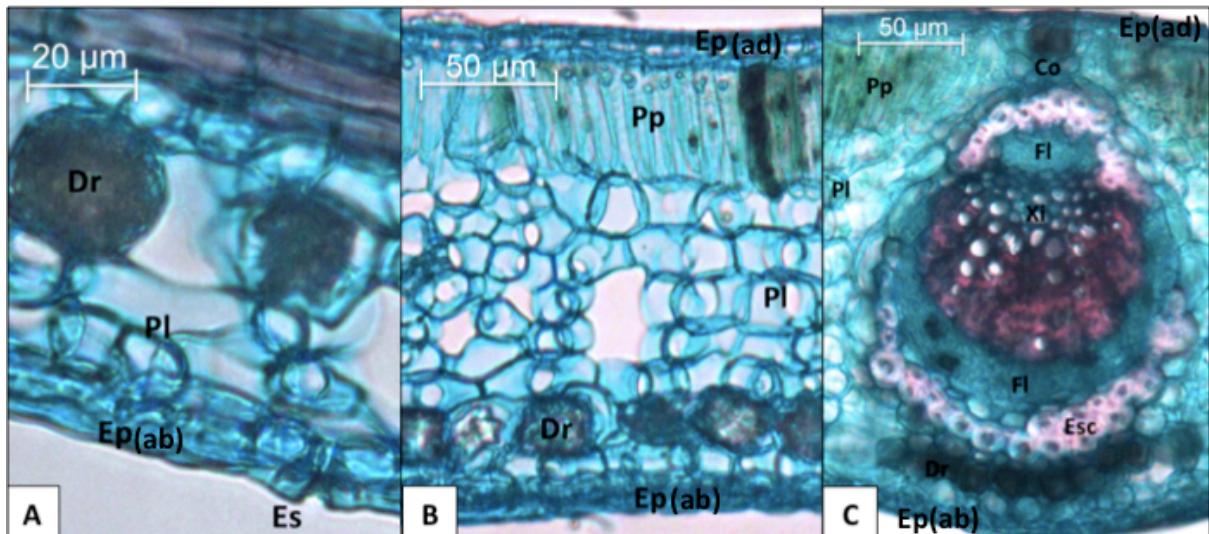
**Figura 6:** Secções paradérmicas da lâmina foliar de *Eugenia uniflora* L. em vista frontal. A, superfície adaxial; B e C, superfície abaxial.



Legenda: Cv – cavidade secretora; Es – estômato. Setas indicam paredes celulares sinuosas.

Na região de internervura, em secções transversais, é possível notar os estômatos presentes ao mesmo nível das células epidérmicas (Figura 7A). Evidencia-se também epiderme unisseriada em ambas as faces, mesofilo dorsiventral, parênquima paliçadico unisseriado (Figura 7B). O parênquima lacunoso apresenta até nove camadas de células, idioblastos estão presentes organizados em série, contendo cristais do tipo drusas e prismáticos. Feixes vasculares de menor calibre são bicolaterais, circundados por uma bainha esclerenquimática (Figura 7C).

**Figura 7:** Região de internervura das folhas de *Eugenia uniflora* L. em secção transversal. A, detalhe do estômato em corte transversal; B, mesofilo dorsiventral; C, feixe vascular de menor calibre.

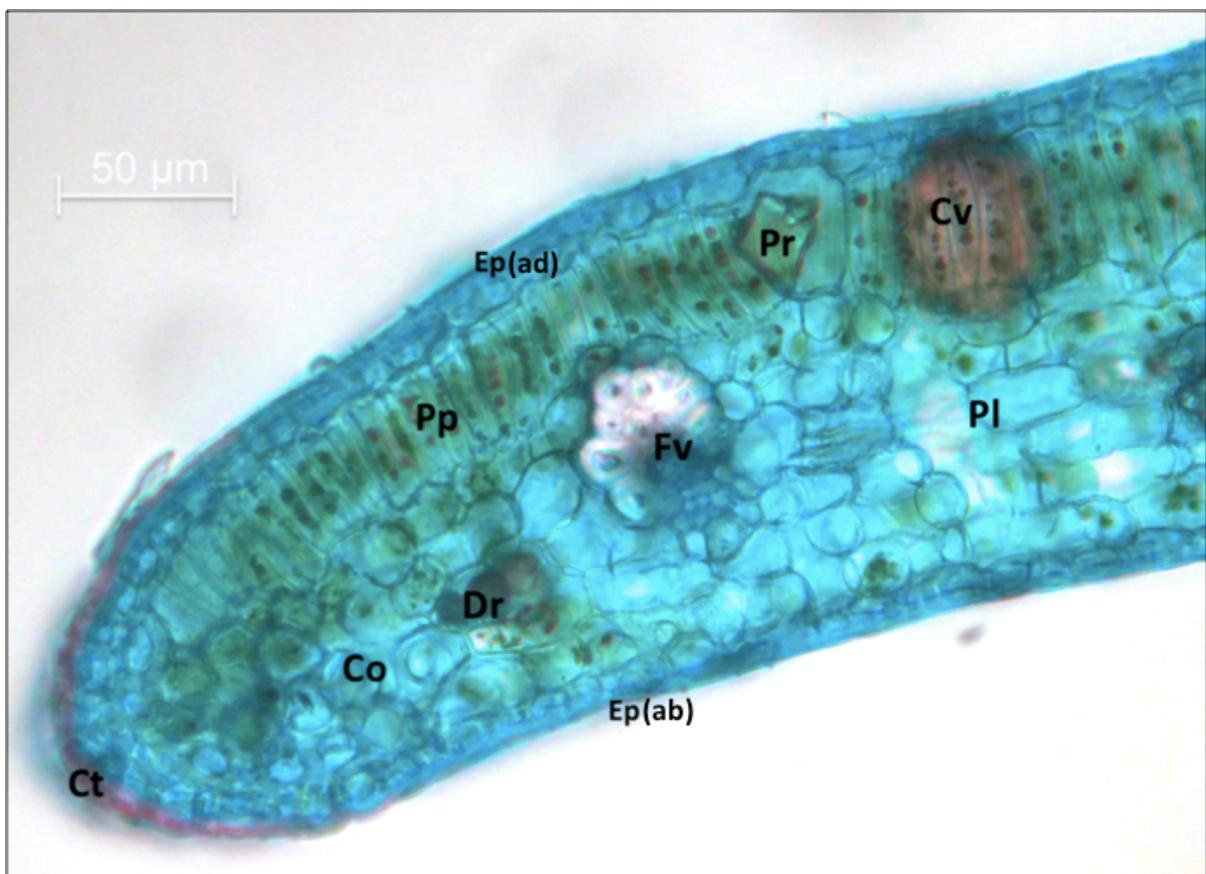


Legenda: Dr – drusas; Pl – parênquima lacunoso; Ep(ab) – epiderme abaxial; Es – Estômato; Ep(ad) – epiderme adaxial; Pp – parênquima paliçádico; Co – colênquima; Fl – floema; Xi – xilema; Esc – esclerênquima.

Lorca, Amat e González (1995) apontaram a classificação do nível dos estômatos em relação às demais células epidérmicas como um dos fatores que permitiram a diferenciação entre *E. uniflora* e *E. pyriformis* Cambess. Segundo Rocha et al. (2008) a forma de organização dos cristais na família Myrtaceae pode apresentar importância diagnóstica.

No bordo foliar, em secções transversais (Figura 8), nota-se que o parênquima paliçádico é gradativamente substituído por células de colênquima, o que confere maior sustentabilidade à região do bordo, e uma espessa camada de cutícula recobre as células epidérmicas. Algumas estruturas secretoras e feixes vasculares podem ser evidenciados nessa região. Segundo Boeger e Wisniewski (2003) o espessamento da cutícula está relacionado com a maior retenção de água, proteção à luz solar e à ação de herbívoros.

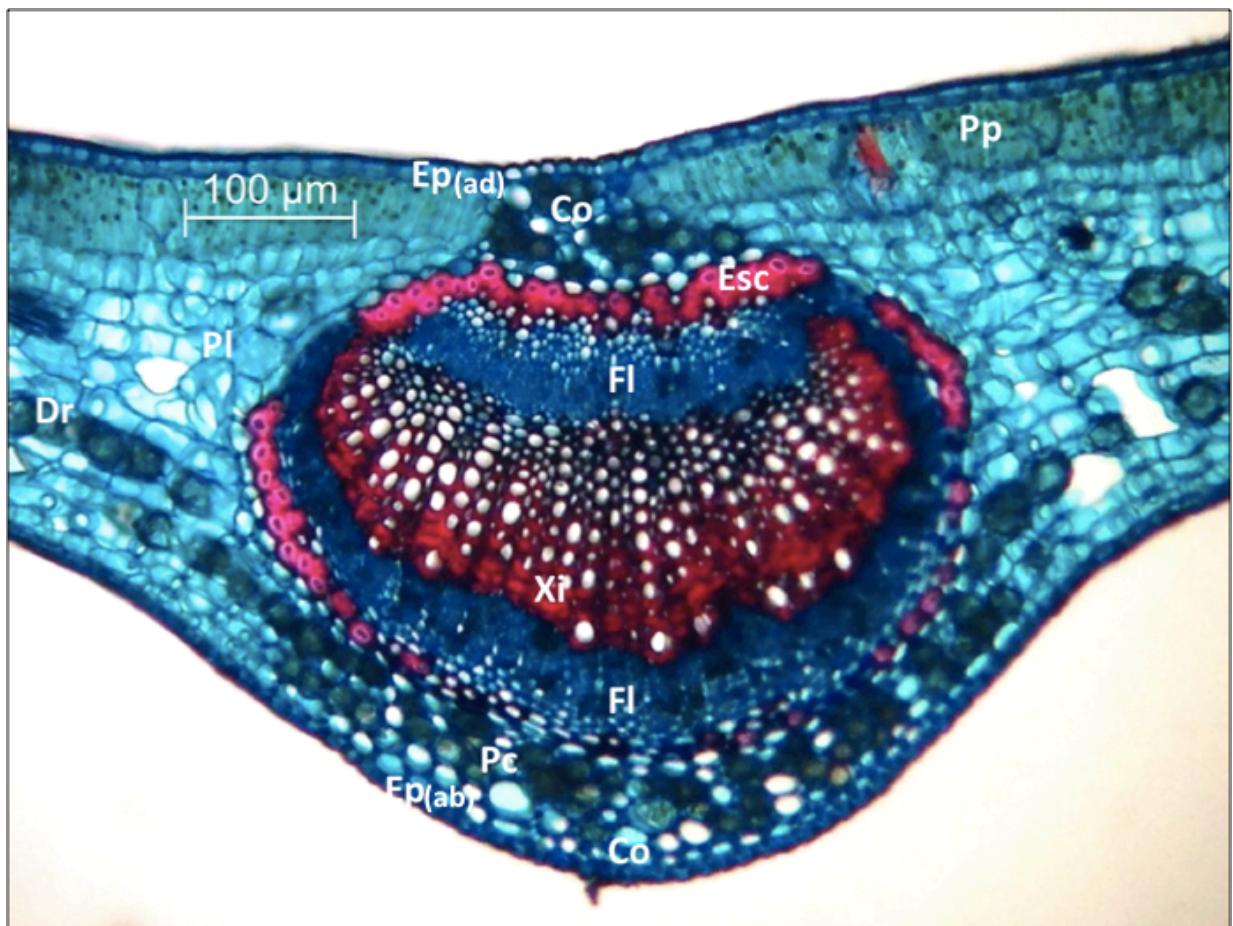
**Figura 8:** Região do bordo das folhas de *Eugenia uniflora* L. em secção transversal.



Legenda: Ct – cutícula; Co – colênquima; Dr – drusas; Pp – parênquima paliçádico; Fv – feixe vascular; Pr – cristal prismático; Cv – Cavidade secretora; Pl – parênquima lacunoso; Ep(ad) – epiderme adaxial; Ep(ab) – epiderme abaxial.

A nervura principal, em secção transversal (Figura 9) apresenta formato plano-convexo, confirmando a proeminência da nervura somente na face abaxial, a epiderme é uniestratificada. As células do parênquima paliçádico, assim como na região de bordo, gradativamente, dão lugar ao colênquima, este pode exibir idioblastos contendo cristais. O sistema vascular é bicolateral em forma de arco aberto e envolto por uma bainha esclerenquimática que confere maior rigidez a esta região (BOEGER & WISNIEWSKI, 2003). Segundo Donato e Morretes (2007), as características, como estrutura dorsiventral e sistema vascular em formato de arco, são comuns para folhas adultas da família Myrtaceae.

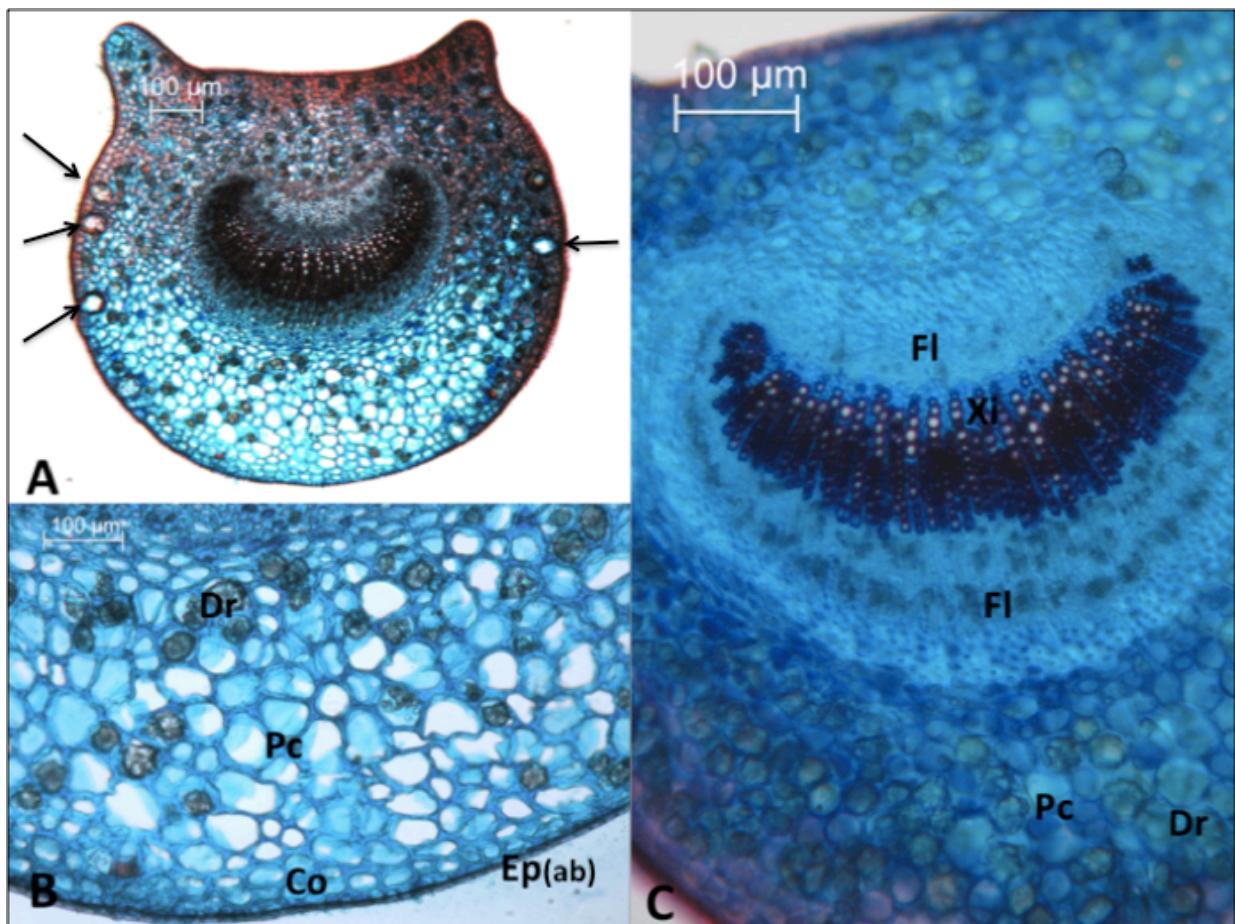
**Figura 9:** Região da nervura principal das folhas de *Eugenia uniflora* L. em secção transversal.



Legenda: Ep(ad) – epiderme adaxial; Ep(ab) – epiderme abaxial; Pp – parênquima paliçadico; Co – colênquima; Esc – esclerênquima, Fl – floema; Pl – parênquima lacunoso; Dr – drusa; Xi – xilema; Pc – parênquima cortical.

O pecíolo apresenta forma côncavo-convexa (Figura 10A), com epiderme unisseriada em ambas as faces, seguida do tecido colenquimatoso que varia de duas a três camadas. A região de córtex é preenchida com até onze camadas de células parenquimáticas e é abundante em cristais dos tipos drusa e prismático em praticamente todas as camadas do tecido (Figura 10B), é possível também evidenciar cavidades secretoras. O feixe vascular tem forma de arco-aberto, com as extremidades voltadas para o centro, é bicolateral e apresenta cristais organizados em série no floema (Figura 10C).

**Figura 10:** Região do pecíolo das folhas de *Eugenia uniflora* L. em secção transversal. A, vista geral do pecíolo; B, detalhe da região cortical; C, detalhe do feixe vascular.



Legenda: Ep(ab) – epiderme abaxial; Dr – drusa; Pc – parênquima cortical; Co – colênquima; Fl – floema; Xi – xilema. Setas indicam cavidades secretoras.

#### 4.2. Obtenção e processamento do material vegetal

#### 4.3. Caracterização do Material Vegetal

O pó obtido das folhas de *E. uniflora* apresentou coloração predominantemente esverdeada, aroma cítrico característico e sabor picante conforme descrito na monografia da planta pela Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

##### 4.3.1. Ensaios de pureza

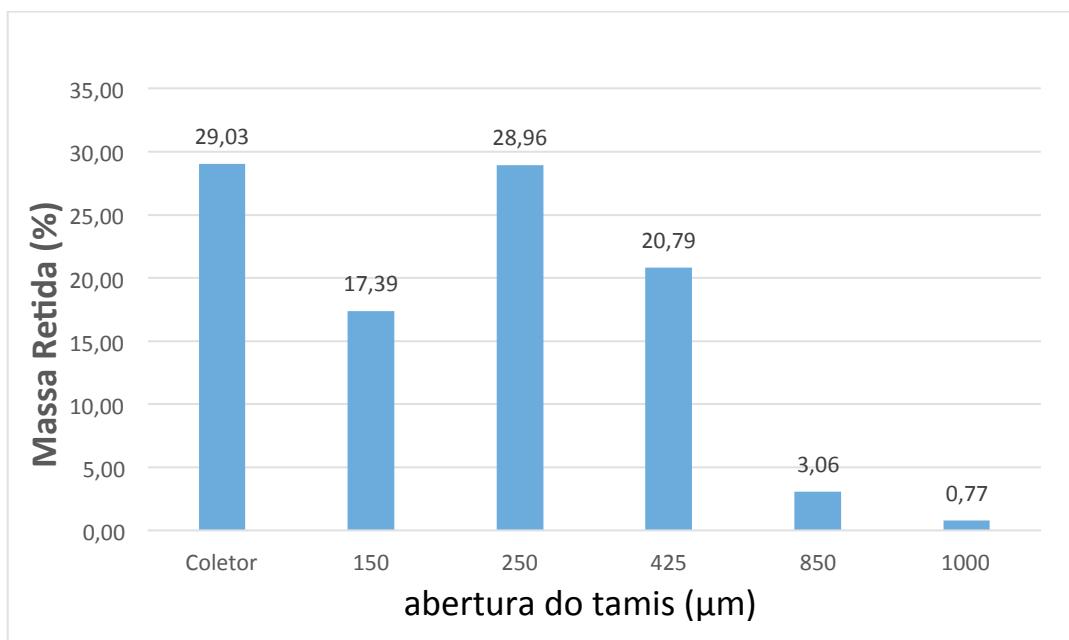
A perda por dessecação do pó das folhas de *E. uniflora* foi de  $8,90\% \pm 0,2$ . O teor de cinzas totais foi de  $9,14\% \pm 0,1$  e  $12,36\% \pm 0,6$  para o teor de cinzas sulfatadas. Estes dados se

apresentaram em conformidade com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010) considerando um valor de umidade inferior a 10%, no máximo 11% de cinzas totais e 14% de cinzas sulfatadas. Outros trabalhos reafirmam estes resultados para as folhas de *E. uniflora* (FIUZA et al., 2008; RODRIGUES, SANDINI & PEREZ, 2010).

#### 4.3.2. Determinação da distribuição granulométrica

Segundo a Farmacopeia Brasileira V (2010) o pó obtido das folhas de *E. uniflora* se aproximou da classificação de pó moderadamente grosso. O gráfico com a distribuição é demonstrado na Figura 11.

**Figura 11:** Distribuição granulométrica das partículas do pó das folhas de *Eugenia uniflora* L.



#### 4.3.3. Determinação do Índice de Intumescência

Os índices de intumescência em água e em etanol 44% (p/p) foram de  $4,16 \pm 0,03$  mL/g e  $4,83 \pm 0,03$  mL/g, respectivamente. Não foram encontrados em outros trabalhos o índice de intumescência do pó das folhas de *E. uniflora*. Couto et al. (2009), em um trabalho com *E. dysenterica* DC, encontrou valores para a intumescência do pó das folhas em água próximos de  $2,73 \pm 23$  mL/g. Estes dados refletem importância na obtenção do extrato líquido por percolação, permitindo prever o volume de solvente extrator que pode ser adicionado durante o processo (COUTO et al., 2009).

#### 4.3.4. Prospecção Fitoquímica

Os resultados dos testes fitoquímicos para a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes no pó das folhas de *E. uniflora* estão expressos na Tabela 8. O perfil de metabólitos secundários encontrados foi semelhante ao dos trabalhos de Fiúza et al. (2008) e Auricchio et al. (2007). Estes dados auxiliaram na seleção de possíveis marcadores a serem avaliados por CLAE no extrato líquido das folhas de *E. uniflora*.

**Tabela 8:** Classes de metabólitos secundários encontradas no pó das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| Classe de Metabólito Secundário | Reação  | Resultado |
|---------------------------------|---|-----------|
| Flavonóides                     | Reação de Shinoda   | Positivo  |
|                                 | Reação oxalo-bórica   | Positivo  |
|                                 | Reação com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado           | Positivo  |
| Compostos Fenólicos             | Reação com hidróxidos alcalinos                                 | Positivo  |
|                                 | Reação com AlCl <sub>3</sub>                                    | Positivo  |
|                                 | Reação com FeCl <sub>3</sub>                                    | Positivo  |
| Heterosídeos Antraquinônicos    | Reação de Bornträger indireta I                                 | Positivo  |
|                                 | Reação de Bornträger indireta II                                | Positivo  |
| Cumarinas                       | Reação com NaOH   | Negativo  |
|                                 | Reação com gelatina   | Positivo  |
|                                 | Reação com alcaloides (Quinino)                                 | Positivo  |
|                                 | Reação com alcaloides (Brucina)                                 | Positivo  |
|                                 | Reação com sais metálicos (Cu <sub>2</sub> (OAc) <sub>4</sub> ) | Positivo  |
|                                 | Reação com sais metálicos (FeCl <sub>3</sub> )                  | Positivo  |
|                                 | Reação com hidróxidos alcalinos (NaOH)                          | Positivo  |
| Taninos                         | Reação com reagente de Mayer                                    | Negativo  |
|                                 | Reação com reagente de Dragendorff                              | Negativo  |
|                                 | Reação com reagente de Bouchardat                               | Negativo  |
|                                 | Reação com reagente de Hager                                    | Negativo  |
|                                 | Reação com ácido tântico  | Negativo  |
| Alcalóides                      | Reação de Liebermann-Burchard                                   | Positivo  |
|                                 | Reação de Pesez   | Positivo  |
|                                 | Reação de Keller-Kiliani  | Positivo  |
|                                 | Reação de Kedde   | Negativo  |
|                                 | Presença de espuma  | Negativo  |
| Saponinas                       |   |           |

A presença de taninos e flavonoides já foi apontada como uma característica comum as espécies do gênero *Eugenia* sendo comumente relatados em ensaios de prospecção fitoquímica da espécie *E. uniflora* (AURICCHIO et al., 2007; FIUZA et al., 2008; ROMAGNOLO & SOUZA, 2006). No presente estudo foi evidenciada a presença destas duas classes de metabólitos secundários em todas as reações testadas.

Fiuza et al. (2008) relatou a presença de saponinas nas folhas de *E. uniflora* coletadas no município de Goiânia no período de fevereiro a abril de 2005. Este grupo de metabólitos não pôde ser observado neste trabalho. Esta variação pode ser devido a diferenças dos parâmetros climáticos e geográficos, como temperatura, altitude, pluviosidade, tipo de solo entre outros.

A identificação de núcleo esteroide e desoxiaçúcares, caracterizada nas reações de Liebermann-Burchad, Pesez e Keller-Kiliani, não podem afirmar a presença de heterosídeos cardioativos, uma vez que, não foi possível identificar presença do anel lactônico característico desta classe de metabólitos secundários pela reação de Kedde.

#### 4.3.5. Caracterização do óleo essencial

O rendimento da extração do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* foi de 1,04% ± 0,22 apresentando-se em conformidade com a especificação da monografia da planta na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). A Tabela 9 mostra os constituintes identificados no óleo essencial e seus respectivos percentuais. Foram identificados 14 constituintes (93,33%), sendo que os constituintes majoritários foram: germacrone (33,71%), eudesma-6,11-dieno (cis) (17,16%) e germacreno B (16,26%) (Figura 12).

Germacrone é um sesquiterpeno oxigenado que já foi anteriormente identificado como constituinte majoritário nas folhas de *E. uniflora* (COSTA et al., 2010; MAIA et al., 1999). Liu et al. (2013) demonstrou seu potencial antiviral na inibição dos estágios iniciais da infecção pelo vírus influenza H1N1 e H3N2. Outros estudos demonstraram seu potencial anti-tumoral *in vitro* frente a cultura de células do fígado e da mama (LIU et al., 2013; ZHONG et al., 2011).

Eudesma-6,11-dieno(cis) e germacreno B são sesquiterpenos não oxigenados frequentemente associados com atividade antifúngica e antioxidante (MAATOOQ et al., 1996; VIEIRA et al., 2011; WU, SHI & JIA, 2006). A presença de germacreno B já foi apontada por outros pesquisadores como constituinte majoritário do óleo essencial obtido das

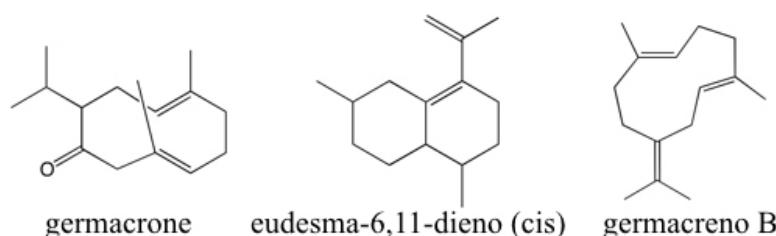
folhas de *E. uniflora* (COSTA et al., 2010; LAGO et al., 2011; MAIA, et al., 1999; SANTOS, BRAZ-FILHO & CASTRO, 2015).

**Tabela 9:** Composição do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| Constituintes                        | IR      | %            |
|--------------------------------------|---------|--------------|
| $\beta$ -Elemeno                     | 1384,27 | 2,15 ± 0,08  |
| (E)-Cariofileno                      | 1412,10 | 5,70 ± 0,19  |
| $\alpha$ -Humuleno                   | 1445,35 | 0,27 ± 0,05  |
| Aromadendreno                        | 1452,59 | 0,62 ± 0,02  |
| $\gamma$ -Muroleno                   | 1473,18 | 3,42 ± 0,09  |
| $\gamma$ -Himachaleno                | 1478,03 | 0,83 ± 0,07  |
| Eudesma-6,11-dieno (cis)             | 1489,57 | 17,16 ± 0,63 |
| Amorfeno                             | 1514,34 | 0,39 ± 0,02  |
| (B)-Germagreno                       | 1551,06 | 16,26 ± 0,26 |
| (B)-Copaen-4- $\alpha$ -ol           | 1569,99 | 4,52 ± 0,20  |
| Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona         | 1622,28 | 5,96 ± 0,16  |
| Atractilona                          | 1651,76 | 0,54 ± 0,04  |
| Germacrone                           | 1692,04 | 33,71 ± 0,02 |
| Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona epoxido | 1734,96 | 1,80 ± 0,11  |
| NI                                   | -       | 6,34 ± 0,41  |
| Sesquiterpenos hidrocarbonetos       |         | 46,80        |
| Sesquiterpenos oxigenados            |         | 46,53        |
| (%) Identificada                     |         | 93,33        |

Legenda: NI – não identificados.

**Figura 12:** Estrutura química dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Eugenia uniflora* L.



Ogunwnde et al. (2005) e Wyerstahl et al. (1988) avaliaram a constituição química do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* coletados na região da Nigéria. Em ambos os estudos houve predomínio de sesquiterpenos oxigenados. Dentre os constituintes majoritários foram identificados no estudo de Ogunwnde et al. (2005), curzereno (19,7%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,8%) e atractilona (16,9%). No Brasil folhas coletadas em Osasco, São Paulo, apresentaram como principais constituintes do óleo essencial atractilona (26,8%), curzereno

(17,9%) e germacreno B (9,31%), exibindo também o predomínio de sesquiterpenos oxigenados (LAGO et al., 2011). Outros estudos apontam diferentes compostos majoritários, entretanto o predomínio permanece entre os compostos sesquiterpênicos (MORAIS et al., 1996; MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

Costa et al. (2009) avaliaram a variabilidade dos constituintes do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* coletadas na cidade de Anápolis, Goiás. Os pesquisadores observaram um maior perfil de sesquiterpenos oxigenados (85-93%) durante o período de seca (meses de abril a setembro). Houve variação dos constituintes majoritários selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona epoxido. Este polimorfismo foi considerado pelos autores como interferência dos fatores sazonais e ecológicos (COSTA et al., 2009).

A monografia da pitangueira na Farmacopeia Brasileira V traz como especificação para o óleo essencial um valor mínimo de 27,0% de curzerenos cis e trans (sesquiterpeno oxigenado) (BRASIL, 2010). No entanto, outros autores não puderam relatar a presença destes constituintes ou, quando relatado, a porcentagem encontrada em relação aos demais constituintes foi inferior a este valor especificado na Farmacopeia (COSTA et al., 2009; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; MELO et al., 2007; LAGO et al., 2011; OGUNWNDE et al., 2005). Estas diferenças ainda podem ser atribuídas a parâmetros climáticos e geográficos (OUYANG et al., 2012).

#### 4.3.6. Doseamento de flavonoides e taninos totais

O doseamento de flavonoides totais expressos em quercetina e de taninos totais expressos em pirogalol apresentou teores de 0,83% ± 0,02 e 1,34% ± 0,23, respectivamente. Estes dados confirmaram a presença destas classes de metabólitos secundários anteriormente identificadas pelos testes de prospecção fitoquímica.

Fiuza et al. (2008) avaliaram o teor de flavonoides nas folhas de *E. uniflora* coletadas em Goiânia, Goiás. Utilizando a metodologia farmacopeica, os autores relataram teores de 0,53%. Folhas de *E. uniflora* coletadas na cidade de São Paulo apresentaram teor de taninos de 2,96%. Os autores utilizaram da reação de polifenóis adsorvidos e não adsorvidos pelo pó de pele para esta avaliação (AURICCHIO et al., 2007).

Estes dados se mostraram divergentes as especificações adotadas pela monografia da planta na Farmacopeia Brasileira V (2010) que preconiza um teor mínimo de 1% de flavonoides totais e 5% de taninos totais nas folhas de *E. uniflora*. Segundo Fiuza et al.

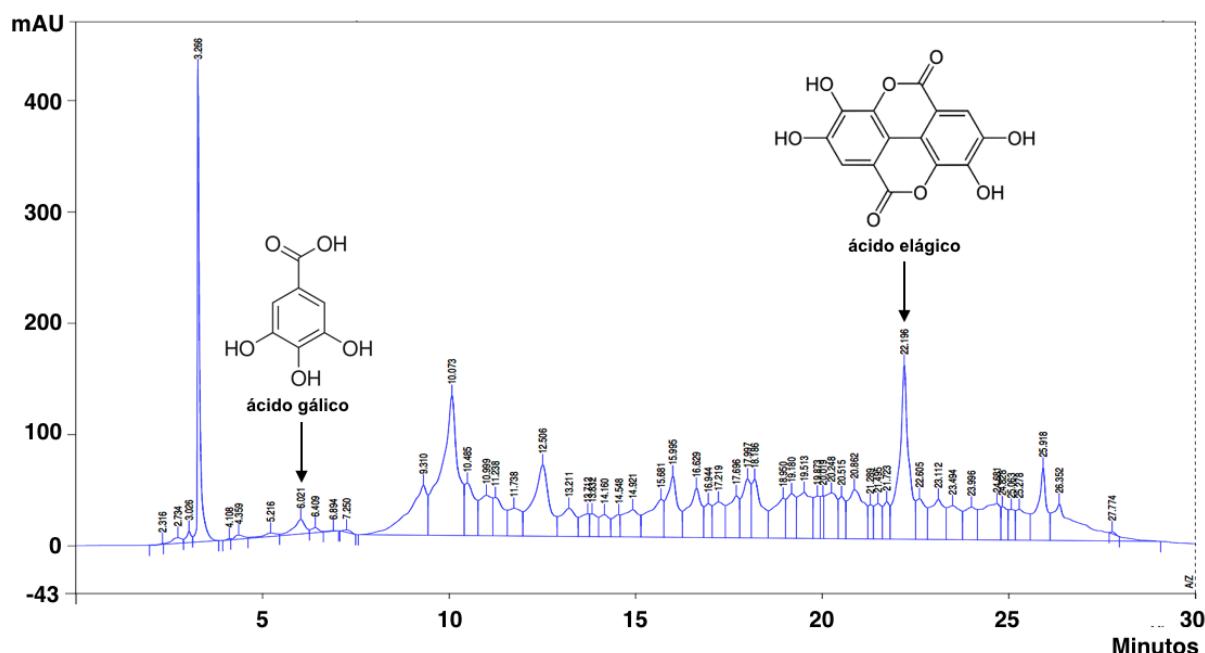
(2008) a interferência de fatores como temperatura, altitude, pluviosidade, tipo de solo entre outros, podem explicar estas diferenças encontradas.

#### 4.4. Desenvolvimento do Método Analítico para identificação e quantificação de ácido elágico por CLAE

#### 4.4.1. Perfil cromatográfico das folhas de *E. uniflora* e seleção do marcador químico

Dentre os sete padrões avaliados pela metodologia adaptada de Kim et al. (2013), foram identificados na amostra do pó das folhas de *E. uniflora* dois constituintes: ácido gálico (6,26 minutos) e ácido elágico (22,84 minutos) (Figura 13).

**Figura 13:** Cromatograma do perfil do extrato líquido das folhas de *Eugenia uniflora* L.



Nota: Condições cromatográficas utilizadas – coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas a 1% (V/V) com ácido acético. 0 min. 2% fase B, 5 min 5% fase B, 12 min. 20% fase B, 15 min. 25% fase B, 18 min. 40% fase B, 25 min. 80% fase B, 28 min. 5% fase B e 30 min. 2% fase B. Fluxo de 1,0 mL/min., o volume de injeção de 10,0 µL e comprimento de onda de 280 nm.

A Tabela 10 demonstra os tempos de retenção para os padrões avaliados e as respectivas áreas para os compostos identificados na solução amostra. O padrão de quercetina não pode ser avaliado pela metodologia uma vez que não apresentou eluição nas condições cromatográficas utilizadas.

**Tabela 10:** Padrões avaliados e seus respectivos tempos de retenção e áreas na solução amostra.

| Analito       | TR na Solução Padrão<br>(min.) | TR na Solução<br>Amostra (min.) | Área do pico na<br>Amostra ( $\mu$ AU.s) |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------|--|
| Ácido Gálico  | 6,02                           | 6,02                            | 293                                      |
| Catequina     | 15,63                          | NI                              | -  |
| Epicatequina  | 19,04                          | NI                              | -  |
| Rutina        | 22,06                          | NI                              | -  |
| Ácido Elágico | 22,20                          | 22,19                           | 2851                                     |
| Hesperidina   | 25,22                          | NI                              | -  |
| Quercetina    | NI                             | NI                              | -  |

Legenda: NI – não identificado.

O pico de ácido elágico foi selecionado como marcador químico para aquisição de parâmetros de qualidade do material vegetal. A escolha do ácido elágico e não do ácido gálico, também identificado na amostra, foi justificada nos parâmetros de tempo de retenção e área dos picos. O tempo de retenção foi levado em consideração pelo fato do pico referente ao ácido gálico apresentar tempo de retenção próximo o tempo de volume morto da metodologia analítica (aproximadamente 2,7 minutos). Desta forma, pequenas alterações na proporção da fase móvel utilizada, poderia contribuir para o aumento da capacidade de eluição da mistura, fazendo com que o tempo de retenção do pico de ácido gálico se sobreponesse ao tempo do volume morto, invalidando assim a metodologia.

A área do pico foi considerada como um parâmetro na seleção do marcador visto que as maiores áreas estariam relacionadas a maiores concentrações do analito, assim é indicativo que o ácido elágico seria um constituinte presente em maiores concentrações em comparação com ácido gálico. De forma complementar, a metodologia utilizada para esta avaliação dispunha de um comprimento de onda de 280 nm; comprimento que por sua vez já foi apontado como a região de pico máximo para avaliação de ácido gálico (KIM et al., 2013). Desta forma acreditava-se que outras regiões do UV, como por exemplo, 254 nm, poderia proporcionar diferenças maiores entre as áreas dos dois picos identificados na solução amostra.

Outros constituintes das folhas de *E. uniflora* já foram apontados e isolados anteriormente. A oenoteína B é um elagitanino macrocíclico que foi inicialmente isolada em folhas das espécies de *Oenothera* (YOSHIDA et al., 1991). Desde 1997 a oenoteína B vem

sendo isolada das folhas de *E. uniflora* (LEE et al., 1997; LEE et al., 2000; SANTOS et al., 2014).

A utilização da oenoteína B como marcador químico para este trabalho foi considerada economicamente inviável pela falta de disponibilidade de um padrão comercial, e quando disponível, o valor agregado ao produto é de aproximadamente 300 vezes maior (1g ácido elágico US\$ 186,92 e 10mg de oenoteína B US\$ 632,54) que o padrão de ácido elágico (SIGMA-ALDRICH, 2015).

A seleção do marcador ácido elágico ainda pode ser justificada no fato de este ser um produto da hidrólise dos elagitaninos permitindo uma avaliação indireta de constituintes já descritos para as folhas de *E. uniflora*, como a própria oenoteína B, a eugeniflorina D<sub>1</sub> e a eugeniflorina D<sub>2</sub> (LEE et al., 1997; LEE et al., 2000).

#### 4.4.2. Seleção do teor alcoólico da solução extratora

Foi observado um comportamento inversamente proporcional entre as áreas do pico de ácido elágico e o grau alcoólico da solução etanólica extratora. Maiores intensidades e áreas de pico foram obtidas utilizando etanol a 50% (p/p). Segundo Simões et al. (2010), a presença de água em solventes orgânicos pode aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos. Ilbay, Sahin e Kirbaslar (2013) avaliaram diferentes concentrações alcoólicas (etanol) na extração de compostos fenólicos das folhas de *Rosa canina* L. e verificaram condições ótimas para a extração com graduações alcoólicas em torno de 40% (v/v). Dados semelhantes foram relatados para a extração de taninos do fruto de *Dipteryx alata* Vogel (MARTINS et al., 2013). Como o ácido elágico é um produto da hidrólise dos elagitaninos, acredita-se que graduações alcoólicas mais baixas acentuaram a extração destes constituintes. Desta forma a solução etanólica a 50% (p/p) foi utilizada para os demais experimentos no estudo de desenvolvimento e posteriormente durante a validação da metodologia analítica por CLAE.

#### 4.4.3. Condições Cromatográficas para CLAE

Uma vez selecionado o marcador, algumas alterações na metodologia de partida adaptada de Kim et al. (2013) foram essenciais para a diminuição de interferentes presentes nos cromatogramas e o aprimoramento da resolução entre os picos.

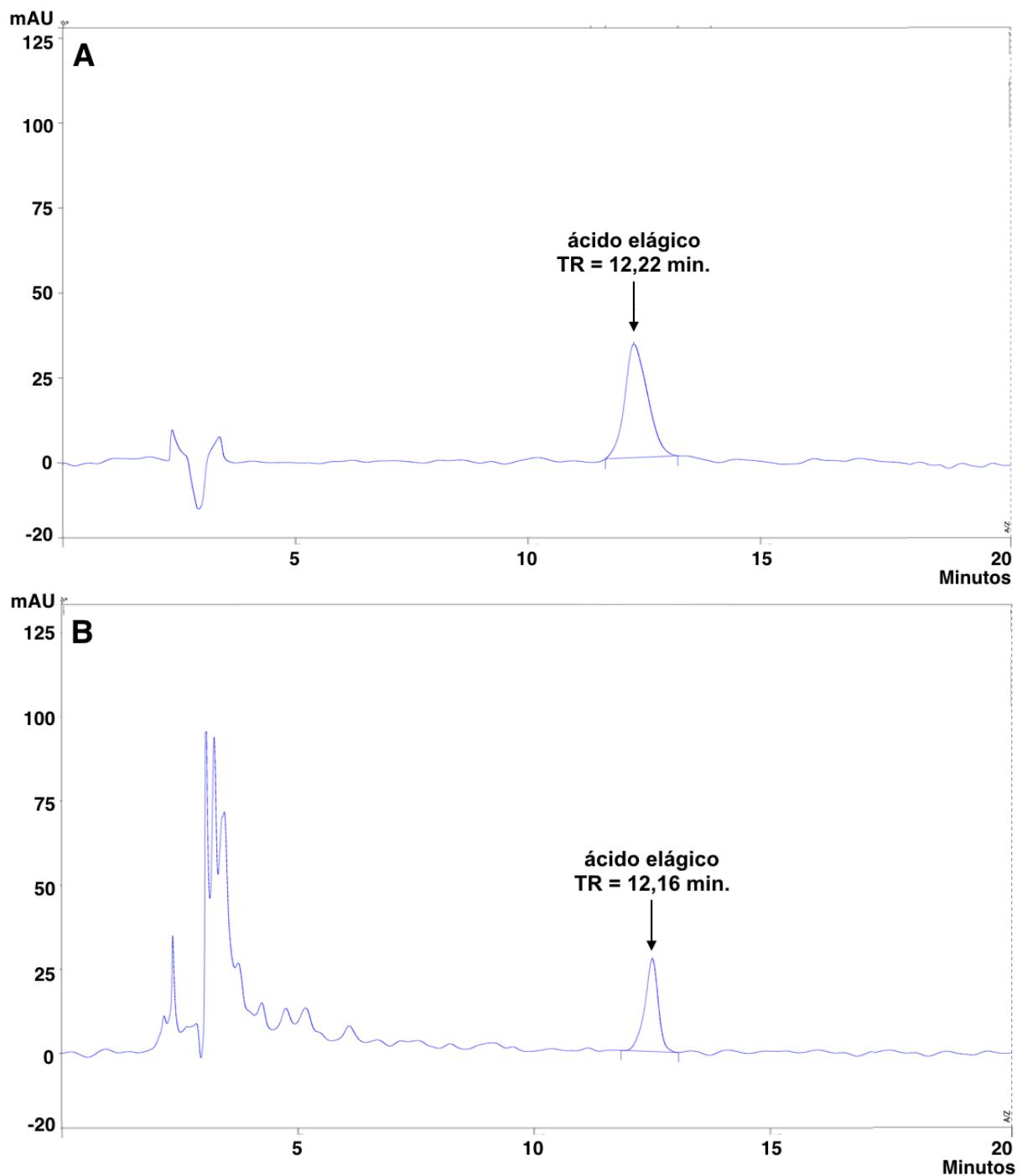
Dentre os parâmetros cromatográficos avaliados, o aumento na proporção inicial de fase orgânica (acetonitrila) no gradiente de eluição, de 2% para 15%, contribuiu para uma maior capacidade de eluição da fase móvel e fez com que muitos picos não identificados fossem co-eluidos no tempo do volume morto da metodologia. Esta alteração tornou a metodologia mais específica para a avaliação do pico referente ao ácido elágico.

Foi observado que ao se prolongar o tempo de duração do gradiente onde se tem a eluição do pico de ácido elágico (40:60 acetonitrila/água) juntamente com a redução do fluxo de 1 mL para 0,5 mL/min, houve melhora significativa na resolução entre os picos. Desta forma este equilíbrio alcançado entre fluxo e proporção de fase móvel foi mantido com 1 mL/min e 15% de fase orgânica (acetonitrila). Por se igualar a proporção inicial do gradiente da metodologia foi proposta uma metodologia isocrática durante 20 minutos na proporção de 15:85 acetonitrila/água e fluxo de 1 mL/minuto. A resolução entre os picos foi mantida.

A fim de se aprimorar a assimetria do pico de ácido elágico e ainda na resolução entre os picos foram testados cinco diferentes agentes acidificantes (ácido fórmico, ácido acético, ácido ortofosfórico, ácido tricloroacético e ácido trifluoracético) para a fase móvel. Dentre eles o ácido tricloroacético apresentou maior impacto sobre os parâmetros de assimetria e resolução em menores concentrações (0,05% p/V).

A Figura 14 demonstra os cromatogramas das soluções padrão de ácido elágico (20 µg/mL) e amostra, obtidos com a metodologia desenvolvida.

**Figura 14:** Cromatogramas da solução padrão ácido elágico (A) e solução amostra do extrato líquido das folhas de *Eugenia uniflora* L. (B) obtidos com a metodologia desenvolvida por CLAE.

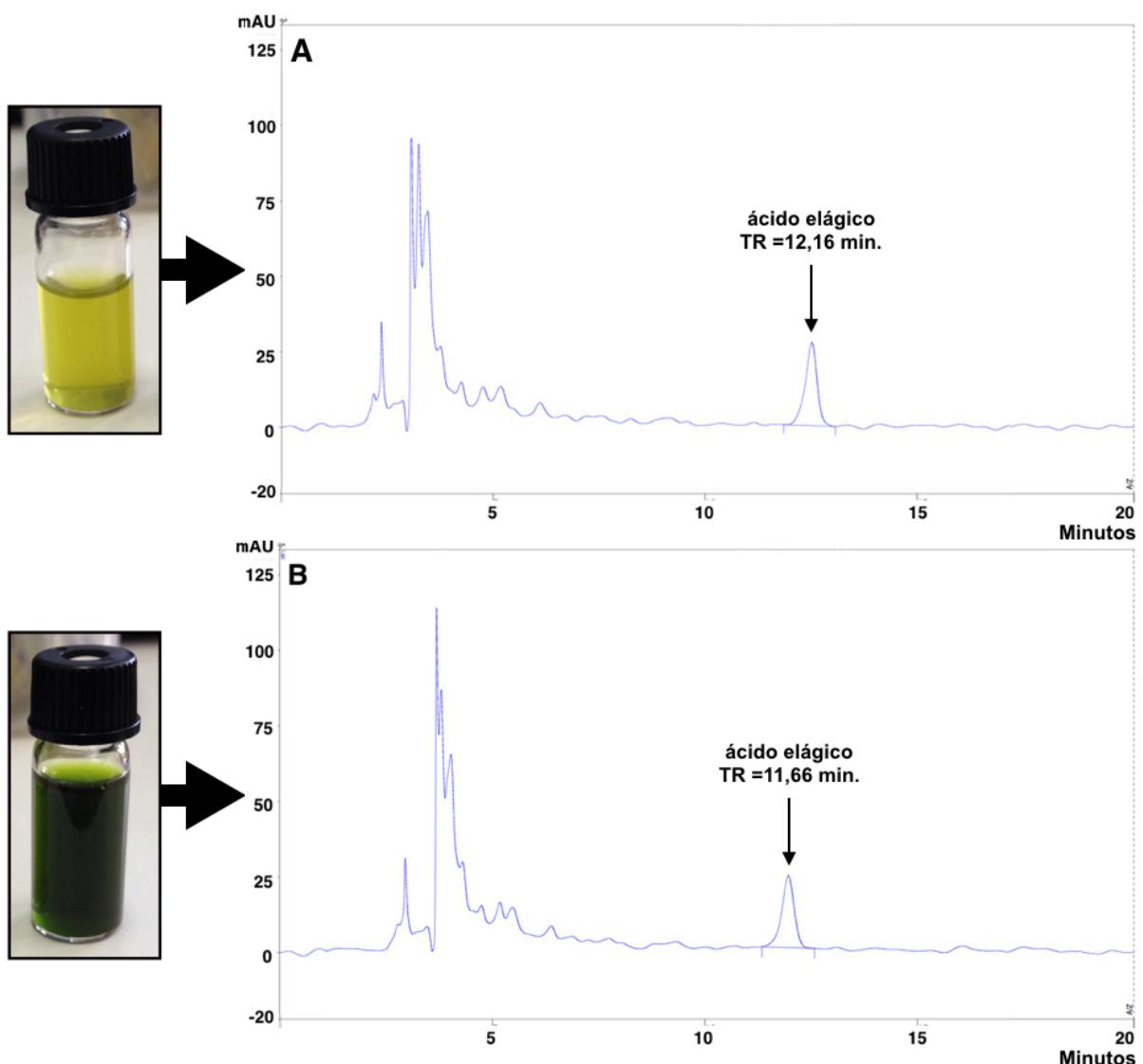


Legenda: TR = tempo de retenção. Nota: Condições cromatográficas utilizadas – coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel água/acetonitrila (85:15), ambas acidificadas a 0,05% (V/V) com ácido tricloroacético. Fluxo de 1,0 mL/min., o volume de injeção de 10,0 µL e comprimento de onda de 254 nm.

#### 4.4.4. Extração em fase sólida (EFS)

A Figura 15 apresenta o aspecto do extrato líquido e os cromatogramas obtidos com (A) e sem EFS (B). Não houve alterações significativas na área e intensidade do pico de ácido elágico obtido com o processo de EFS e sem a EFS. A EFS auxiliou na extração de componentes da matriz vegetal sem que houvesse alteração na concentração do marcador. A obtenção de uma amostra mais pura pode levar a uma maior durabilidade da coluna cromatográfica, tornando a metodologia por CLAE mais viável. Desta forma a EFS foi incorporada à metodologia analítica por CLAE para o preparo da amostra do extrato líquido.

**Figura 15:** Aspecto do extrato líquido e chromatogramas obtidos com (A) e sem (B) EFS.



Legenda: TR = tempo de retenção. Nota: Condições cromatográficas – coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel água/acetonitrila (85:15), ambas acidificadas a 0,05% (V/V) com ácido tricloroacético. Fluxo de 1,0 mL/min., o volume de injeção de 10,0 µL e comprimento de onda de 254 nm.

#### 4.4.5. Determinação da proporção droga/solvente

Dentre as três proporções droga/solvente avaliadas, a proporção de 10% (p/V) apresentou melhores parâmetros cromatográficos para avaliação do pico de ácido elágico. A área do pico de ácido elágico encontrada para esta proporção foi de 990 µAU.s.

### 4.5. Validação da metodologia analítica por CLAE

#### 4.5.1. Adequabilidade do Sistema

A Tabela 11 demonstra os valores obtidos para os parâmetros avaliados na adequabilidade do sistema com base em seis replicatas de uma mesma preparação da solução amostra do extrato líquido das folhas de *E. uniflora*.

**Tabela 11:** Parâmetros avaliados na adequabilidade do sistema.

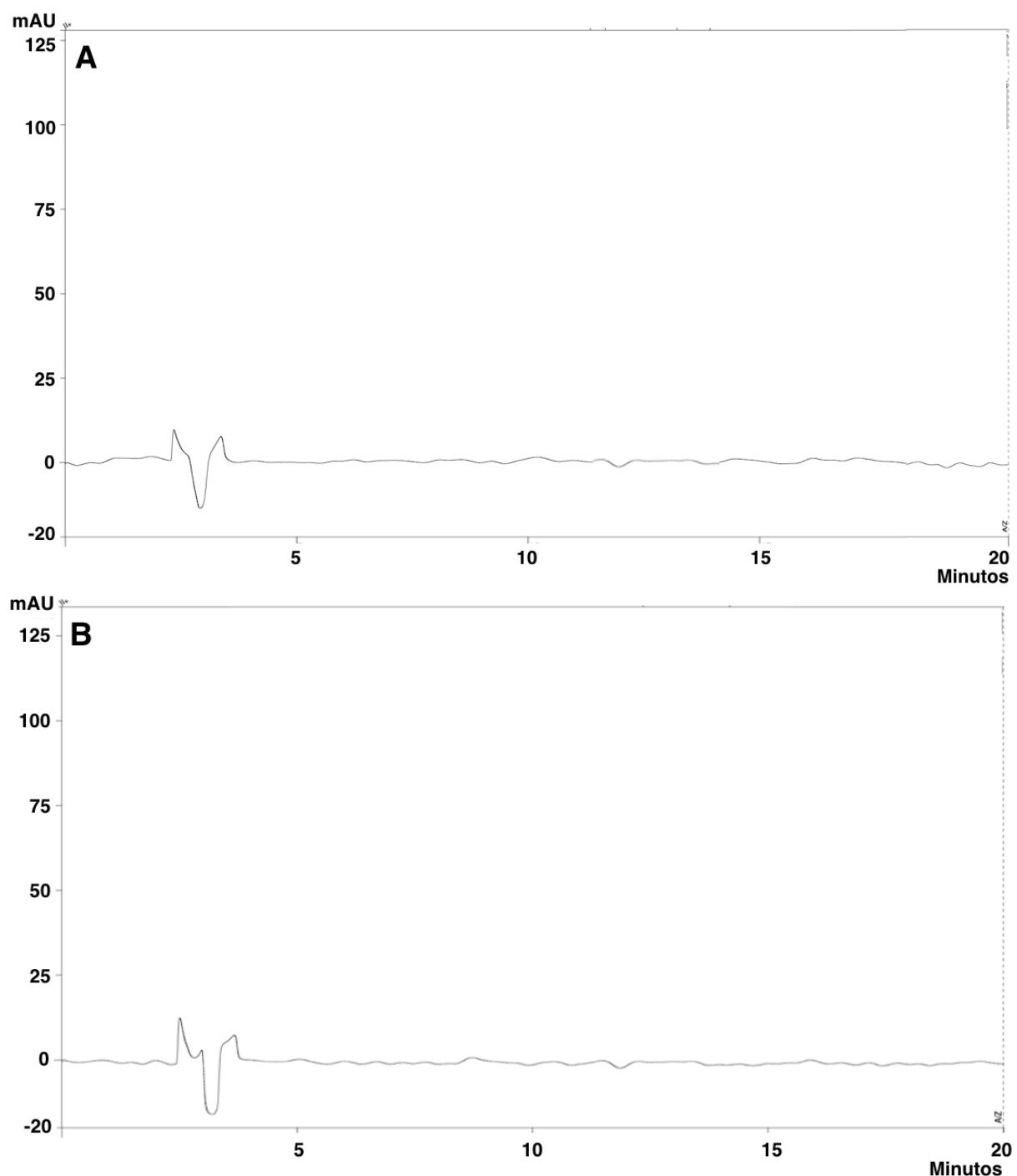
| Replicata     | Tempo de Retenção (min.) | Área (mAU.s) | Pratos teóricos | k prime | Tailing |
|---------------|--------------------------|--------------|-----------------|---------|---------|
| 1             | 12,86                    | 1322         | 3735            | 11,86   | 1,5     |
| 2             | 12,58                    | 1313         | 3405            | 11,59   | 1,5     |
| 3             | 12,75                    | 1320         | 3699            | 11,76   | 1,5     |
| 4             | 12,57                    | 1354         | 3309            | 11,58   | 1,5     |
| 5             | 13,15                    | 1302         | 3388            | 12,16   | 1,5     |
| 6             | 12,76                    | 1310         | 3678            | 11,77   | 1,5     |
| Média         | 12,78                    | 1320,17      | 3535,67         | 11,79   | 1,5     |
| Desvio Padrão | 0,21                     | 18,07        | 188,11          | 0,21    | 0       |
| DPR           | 1,67                     | 1,37         | 5,32            | 1,81    | 0       |

Legenda: DPR – desvio padrão relativo

#### 4.5.2. Especificidade

A especificidade da metodologia foi comprovada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente (80:20 água/metanol), da fase móvel (85:15 água/acetonitrila 0,05% ácido tricloroacético) e da solução amostra do extrato líquido (Figura 16).

**Figura 16:** Cromatogramas do diluente (A) e fase móvel (B).



Nota: Condições cromatográficas – coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel água/acetonitrila (85:15), ambas acidificadas a 0,05% (V/V) com ácido tricloroacético. Fluxo de 1,0 mL/min., o volume de injeção de 10,0 µL e comprimento de onda de 254 nm.

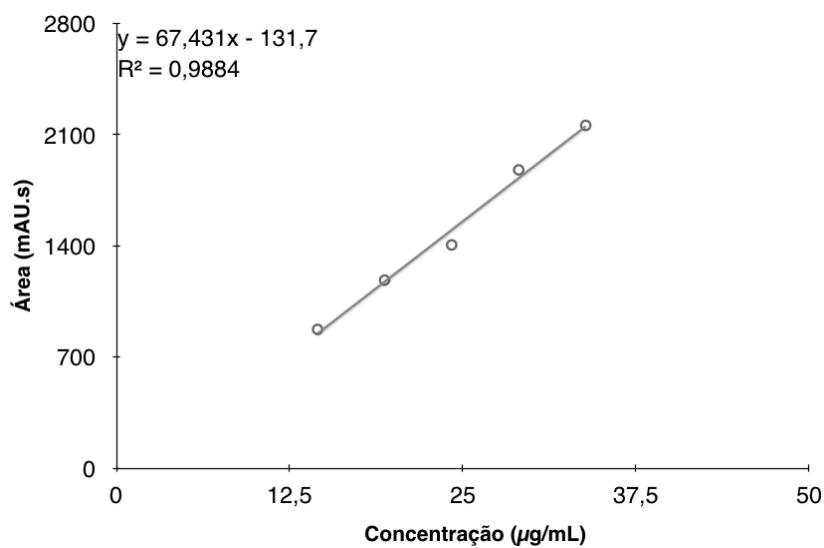
A seletividade ou especificidade de uma metodologia pode ser traduzida na capacidade da mesma de avaliar uma substância na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2014). No presente teste não foi observada interferência por co-eluição do diluente ou fase móvel no tempo de

retenção do ácido elágico a 254 nm, demonstrando a seletividade da metodologia desenvolvida.

#### 4.5.3. Linearidade

A metodologia mostrou-se linear no intervalo avaliado para o padrão de ácido elágico (14,5 a 33,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A curva padrão apresentou coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,994 e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 98,84% como demonstrado na Figura 17. A Tabela 12 contém as áreas dos picos de ácido elágico utilizadas para a construção da curva padrão. Estes dados se mostraram em conformidade com as especificações da Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA demonstrando a capacidade da metodologia em determinar áreas diretamente proporcionais à concentração de ácido elágico.

**Figura 17:** Curva padrão de ácido elágico para avaliação da linearidade.



Legenda:  $R^2$  – coeficiente de determinação.

**Tabela 12:** Áreas dos picos de ácido elágico na solução padrão.

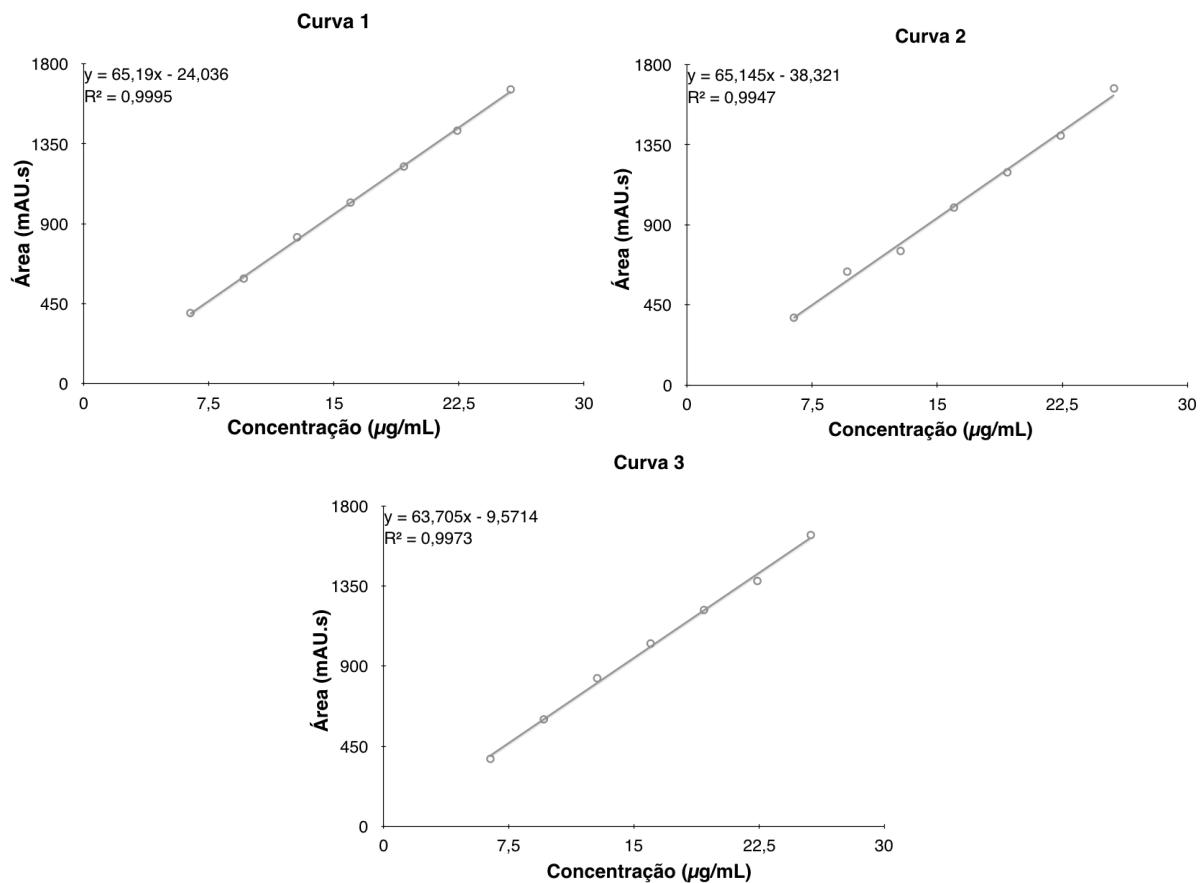
| <b>%</b> | <b>µg/mL</b> | <b>Área (mAU.s)</b>  | <b>Média</b> | <b>Desv.pad</b> | <b>DPR</b> |
|----------|--------------|----------------------|--------------|-----------------|------------|
| 60       | 14,52        | 902<br>883<br>837    | 874,00       | 33,42           | 3,82       |
| 80       | 19,36        | 1202<br>1197<br>1153 | 1184,00      | 26,96           | 2,28       |
| 100      | 24,20        | 1411<br>1438<br>1368 | 1405,67      | 35,30           | 2,51       |
| 120      | 29,04        | 1895<br>1875<br>1865 | 1878,33      | 15,28           | 0,81       |
| 140      | 33,88        | 2180<br>2135<br>2161 | 2158,67      | 22,59           | 1,05       |

Legenda: Desv.pad – desvio padrão. DPR – desvio padrão relativo.

#### 4.5.4. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites encontrados com base nas três curvas padrão de ácido elágico foram de 0,66 µg/mL para o LD e 2,22 µg/mL para o LQ. As equações das retas e os coeficientes são demonstrados na Figura 18. A Tabela 13 contem as áreas dos picos de ácido elágico na solução padrão utilizados para a construção das curvas.

**Figura 18:** Curvas padrão de ácido elágico para determinação dos limites de detecção e quantificação.



Legenda:  $R^2$  – coeficiente de determinação.

**Tabela 13:** Áreas dos picos de ácido elágico nas soluções padrão utilizadas na construção das curvas padrão para a determinação dos limites de detecção e quantificação.

| <b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Curva 1</b>          | <b>Curva 2</b>          | <b>Curva 3</b>          |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | <b>Área<br/>(mAU.s)</b> | <b>Área<br/>(mAU.s)</b> | <b>Área<br/>(mAU.s)</b> |
| 6,4   | 397                     | 378                     | 379                     |
| 9,6   | 591                     | 637                     | 601                     |
| 12,8  | 824                     | 753                     | 832                     |
| 16,0  | 1019                    | 997                     | 1027                    |
| 19,2  | 1222                    | 1195                    | 1215                    |
| 22,4  | 1424                    | 1401                    | 1378                    |
| 25,6  | 1656                    | 1667                    | 1636                    |

O LD, determinado com base no cálculo de regressão linear, é considerado como a menor concentração detectável, mas não necessariamente quantificável, do analito em uma solução. A menor concentração quantificável do analito em uma solução é traduzida no valor de LQ (KLEIN, LONGHINI & MELLO, 2012). Desta forma é de interesse para as demais

avaliações que a concentração de ácido elágico permaneça acima de 2,22 µg/mL para que a metodologia analítica possa quantificar o marcador com precisão e exatidão.

#### 4.5.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2014). No presente estudo os dados de precisão da metodologia foram expressos pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) obtido pela relação entre o desvio padrão entre os dados e a média. O valor do DPR para as áreas de ácido elágico no teste de repetibilidade foi de 3,51%. A precisão intermediária da metodologia foi determinada em um segundo dia pelo mesmo analista. Os dados das seis preparações da amostra de extrato líquido estão descritos na Tabela 14. O DPR entre os dados obtidos dos dois dias foi de 4,46%. Estes resultados se mostraram em conformidade com a especificação (DPR<15%) (BRASIL, 2014).

**Tabela 14:** Dados do teste de precisão.

| <b>Amostra</b> | <b>Repetibilidade</b>   |                                 | <b>Precisão Intermediária</b> |                                 |
|----------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                | <b>Área<br/>(µAU.s)</b> | <b>Concentração<br/>(µg/mL)</b> | <b>Área<br/>(mAU.s)</b>       | <b>Concentração<br/>(µg/mL)</b> |
| 1              | 1302                    | 20,5                            | 1445                          | 22,7                            |
| 2              | 1266                    | 19,9                            | 1410                          | 22,2                            |
| 3              | 1364                    | 21,5                            | 1440                          | 22,6                            |
| 4              | 1287                    | 20,3                            | 1379                          | 21,7                            |
| 5              | 1387                    | 21,8                            | 1436                          | 22,6                            |
| 6              | 1328                    | 20,9                            | 1370                          | 21,6                            |
| Média          | 1322,3333               | 20,8                            | 1413,3333                     | 22,2                            |
| Desvio padrão  | 46,4442                 | 0,0007                          | 32,5433                       | 0,0005                          |
| DPR            | 3,5123                  | 3,4497                          | 2,3026                        | 2,2642                          |

Legenda: DPR – desvio padrão relativo. Nota: concentração de ácido elágico expressa em µg/mL da solução final injetada em CLAE.

#### 4.5.6. Exatidão

A exatidão de um método pode ser abordada como a concordância entre os resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (BRASIL, 2014). A metodologia demonstrou exatidão, representada nos valores de recuperação entre 105,13% e 110,61% para o teste, conforme apresentado na Tabela 15. Estes dados estão em

conformidade com a especificação adotada para o teste em matrizes complexas (80-120%) segundo o *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

**Tabela 15:** Recuperação do padrão de ácido elágico adicionado à amostra.

| Nível de concentração do extrato | Conc. teórica de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Área de ácido elágico (mAU.s) | Área de ácido elágico + padrão (mAU.s) | Conc. de ácido elágico + padrão ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Média ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Recuperação (%) |  |
|----------------------------------|---|-------------------------------|--|--|----------------------------|-----------------|--|
| Padrão                           | 16.00   | 423                           | -                                      | -  | -                          | -               |  |
|                                  |   | 486                           | -                                      | -  | -                          | -               |  |
|                                  |   | 481                           | -                                      | -  | -                          | -               |  |
| 80%                              | 15.26   | 440                           | 978                                    | 15.50  |                            |                 |  |
|                                  |   | 450                           | 916                                    | 14.50  | 15.00                      | 105.14          |  |
|                                  |   | 412                           | 945                                    | 15.00  |                            |                 |  |
| 100%                             | 19.08   | 517                           | 1040                                   | 16.40  |                            |                 |  |
|                                  |   | 509                           | 1007                                   | 15.90  | 16.40                      | 107.19          |  |
|                                  |   | 522                           | 1068                                   | 16.90  |                            |                 |  |
| 120%                             | 22.90   | 627                           | 1195                                   | 18.80  |                            |                 |  |
|                                  |   | 674                           | 1183                                   | 18.70  | 18.80                      | 110.61          |  |
|                                  |   | 653                           | 1193                                   | 18.80  |                            |                 |  |
| Média da recuperação (%)         |   |                               |  |  |                            | 107.64          |  |
| DPR                              |   |                               |  |  |                            | 2.57            |  |

Legenda: DPR – desvio padrão relativo.

#### 4.5.7. Robustez

Um método é considerado robusto quando demonstra capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações (BRASIL, 2014). Segundo a ICH (2005) a robustez deve ser avaliada durante o desenvolvimento do método por CLAE devendo demonstrar repetibilidade de avaliação para as alterações nos parâmetros da metodologia.

A Tabela 16 apresenta os dados obtidos para os testes de robustez da metodologia analítica. Todos os DPR permaneceram abaixo de 5% e a porcentagem da avaliação das médias em relação a condição normal da metodologia variou entre 73,30 e 107,32%. Considerando uma variação entre 90-110% em relação a condição normal a metodologia não demonstrou robustez para a variação de -10% em seu volume de injeção.

**Tabela 16:** Dados da avaliação de robustez da metodologia.

| Condição                | Área 1<br>(mAU.s) | Área 2<br>(mAU.s) | Área 3<br>(mAU.s) | Média   | DPR  | Robustez<br>(%) |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|------|-----------------|
| Normal                  | 1541              | 1570              | 1437              | 1516,00 | 4,61 | -               |
| Fluxo 9 mL/min.         | 1643              | 1654              | 1584              | 1627,00 | 2,31 | 107,32          |
| Fluxo 11 mL/min.        | 1409              | 1419              | 1419              | 1415,67 | 0,41 | 93,38           |
| Volume de injeção 9 µL  | 1089              | 1151              | 1112              | 1117,33 | 2,81 | 73,70           |
| Volume de injeção 11 µL | 1557              | 1510              | 1574              | 1547,00 | 2,14 | 102,04          |
| Lote da coluna          | 1550              | 1544              | 1538              | 1544,00 | 0,39 | 101,85          |

Legenda: DPR – desvio padrão relativo.

#### 4.6. Obtenção e caracterização do extrato líquido a partir das folhas de *E. uniflora*

##### 4.6.1. Otimização das condições de EAU para a obtenção de ácido elágico das folhas de *E. uniflora*

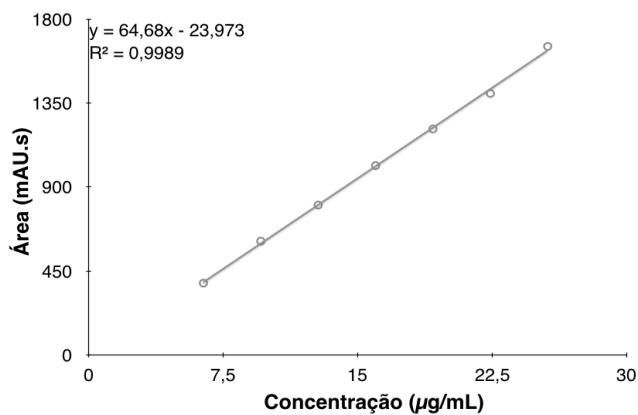
O método de EAU é abordado como uma alternativa moderna de extração (YOLMEH, NAJAFI & FARHOOK, 2014; SAHIN, AYBASTIER & ISIK, 2013). Em comparação com os métodos de extração convencionais que envolvem aquecimento e refluxo, a EAU oferece uma alternativa com menores perdas de compostos fenólicos devido a oxidação, ionização e hidrólise (LI, CHEN & YAO, 2005). Em vista de outras técnicas modernas como, extração em fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas, a EAU é considerada uma técnica de baixo custo, simples e eficiente (WANG et al., 2013). Seu mecanismo de extração é atribuído ao fenômeno de cavitação, a interação de forças mecânicas e ao impacto térmico. O que proporciona a ruptura da parede celular, a redução do tamanho de partículas e o aumento da transferência de massa através da membrana celular (HOSSAIN et al., 2012).

O aprimoramento da performance de um sistema, processo ou produto com o intuito de se obter maior benefício pode ser compreendido no conceito de otimização (BEZERRA et al., 2008). Nos últimos anos a utilização de ferramentas de análise multivariada tem sido frequentemente empregada na otimização de métodos analíticos principalmente devido a redução no número de experimentos e consequentemente em gastos com a pesquisa. Além do mais, estas ferramentas permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos na avaliação de interações entre as variáveis estudadas (FERREIRA et al., 2007).

Neste trabalho foi selecionado o delineamento Box-Behnken 3<sup>3</sup> como ferramenta de análise multivariada na avaliação da influência das variáveis independentes: teor alcoólico (%), p/p), tempo (minutos) e temperatura de extração (°C) sobre a concentração de ácido

elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ) no extrato líquido das folhas de *E. uniflora* obtido por EAU. Para tanto, realizou-se uma nova curva padrão com a metodologia já validada para quantificação de ácido elágico nas amostras do extrato líquido (Figura 19). A Tabela 17 mostra a matriz experimental do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) utilizada na otimização da metodologia de EAU. A concentração de ácido elágico variou entre 8,0 e 26,3 expressos em  $\mu\text{g/mL}$  da concentração final da solução injetada na CLAE.

**Figura 19:** Curva padrão de ácido elágico para a quantificação desse marcador nas amostras do extrato líquido das folhas de *Eugenia uniflora* L. utilizadas no estudo de otimização da EAU.



Legenda:  $R^2$  – coeficiente de determinação.

**Tabela 17:** Matriz experimental do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e concentração de ácido elágico para a EAU das folhas de *Eugenia uniflora* L.

|    | Grau alcoólico | Tempo | Temperatura | Ácido Elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----|----------------|-------|-------------|------------------------------------|
| 1  | 40             | 20    | 45          | 21,7                               |
| 2  | 80             | 20    | 45          | 9,2                                |
| 3  | 40             | 40    | 45          | 14,5                               |
| 4  | 80             | 40    | 45          | 8,1                                |
| 5  | 40             | 30    | 30          | 13,1                               |
| 6  | 80             | 30    | 30          | 8,7                                |
| 7  | 40             | 30    | 60          | 20,6                               |
| 8  | 80             | 30    | 60          | 14,5                               |
| 9  | 60             | 20    | 30          | 8,0                                |
| 10 | 60             | 40    | 30          | 11,1                               |
| 11 | 60             | 20    | 60          | 26,3                               |
| 12 | 60             | 40    | 60          | 17,3                               |
| 13 | 60             | 30    | 45          | 15,0                               |
| 14 | 60             | 30    | 45          | 14,6                               |
| 15 | 60             | 30    | 45          | 16,4                               |

Nota: concentração de ácido elágico expressa em  $\mu\text{g/mL}$  da solução final injetada em CLAE.

As análises dos dados foram realizadas por ANOVA e regressão linear múltipla empregando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os resultados são exibidos na Tabela 18. A ideia central da análise de variância (ANOVA) é a de comparar as variâncias dos diferentes tratamentos com a variância decorrente do erro do experimento e assim determinar a significância da regressão adotada para prever respostas (BEZERRA et al., 2008). Sendo assim, o modelo foi significativo ( $p = 0,000358$ ), não demonstrando falta de ajuste ( $p = 0,097575$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9321.

**Tabela 18:** Sumário dos valores de  $p$  efeitos lineares (L), quadráticos (Q) e interações, das variáveis independentes avaliadas pelo modelo Box Behnken ( $3^3$ ) na otimização da EAU.

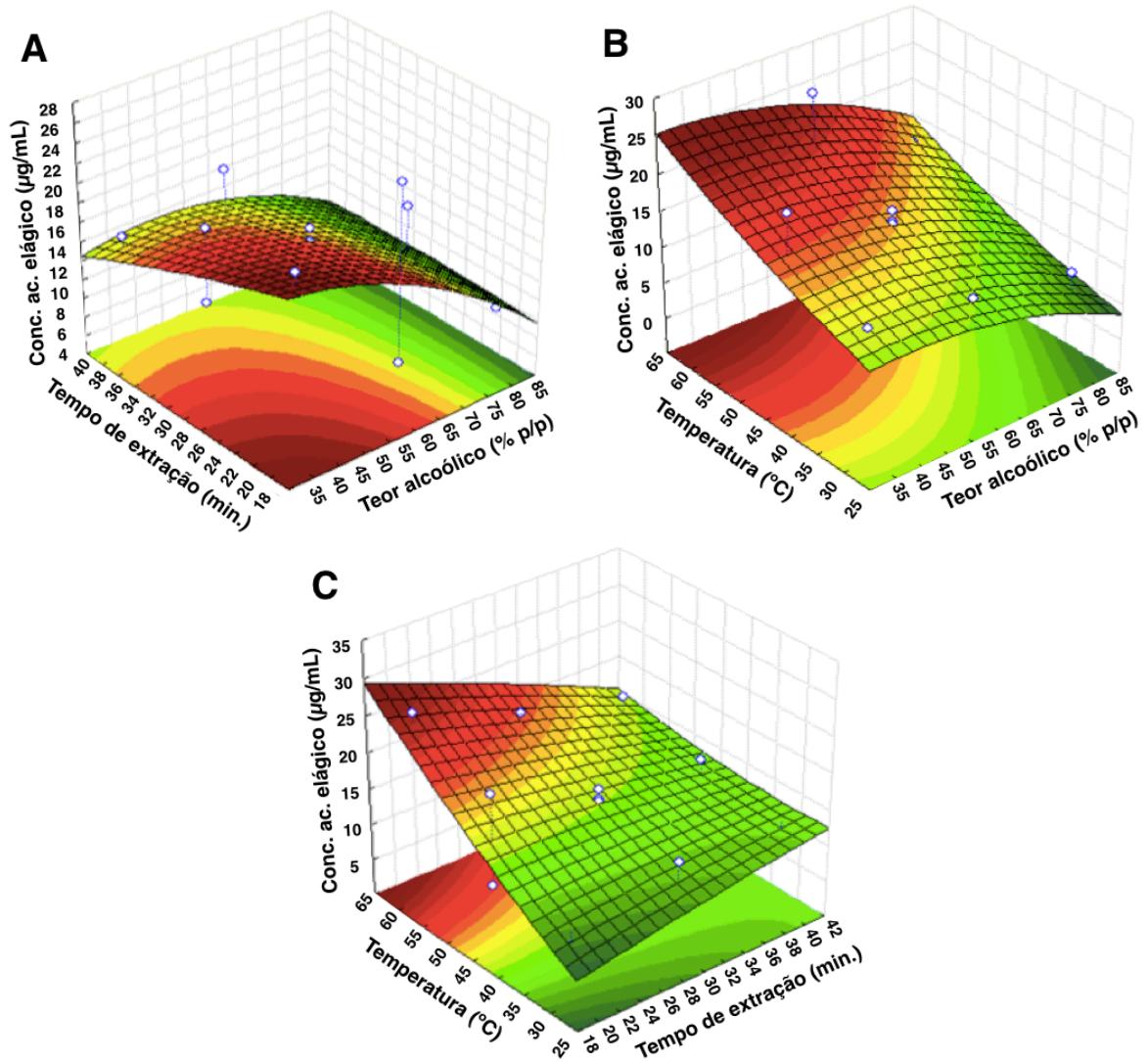
| Parâmetro | <i>p</i>   | Ácido elágico<br>efeito |
|-----------|------------|-------------------------|
| 1L        | 0,008167*  | -0,007350               |
| 1Q        | 0,074161** | 0,001704                |
| 2L        | 0,033663*  | -0,003550               |
| 2Q        | 0,656810   | 0,000254                |
| 3L        | 0,004965*  | 0,009450                |
| 3Q        | 0,349469*  | -0,000596               |
| 1L e 2L   | 0,084095** | 0,003050                |
| 1L e 3L   | 0,463396   | -0,000850               |
| 2L e 3L*  | 0,023548*  | -0,006050               |

Legenda: 1 – grau alcoólico, 2 – tempo de extração e 3 temperatura de extração. L – linear, Q – quadrático  
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,1$ .

Como a extração de compostos fenólicos depende amplamente da polaridade dos solventes, é possível que um único solvente não seja eficiente para a extração dos compostos bioativos (WANG et al., 2013). Consequentemente, a combinação de álcool e água é mais eficiente na extração de compostos fenólicos do que somente o álcool (GAN & LATTIF, 2011). Neste trabalho, o teor alcoólico da solução extratora apresentou efeito linear negativo sobre a concentração de ácido elágico (Tabela 18), indicando que graduações alcoólicas menores proporcionariam uma maior extração do marcador nas folhas de *E. uniflora*. Dados semelhantes foram relatados nos trabalhos Ilbay, Sahin e Kirbaslar (2013) e Martins et al., (2013).

Os efeitos lineares das variáveis independentes tempo e temperatura de extração foram significativos, bem como a interação entre eles (Tabela 18). Com exceção da temperatura de extração, as demais variáveis apresentaram efeito negativo sobre a concentração de ácido elágico como pode ser observado nos gráficos de superfície de resposta, ilustrados na Figura 20.

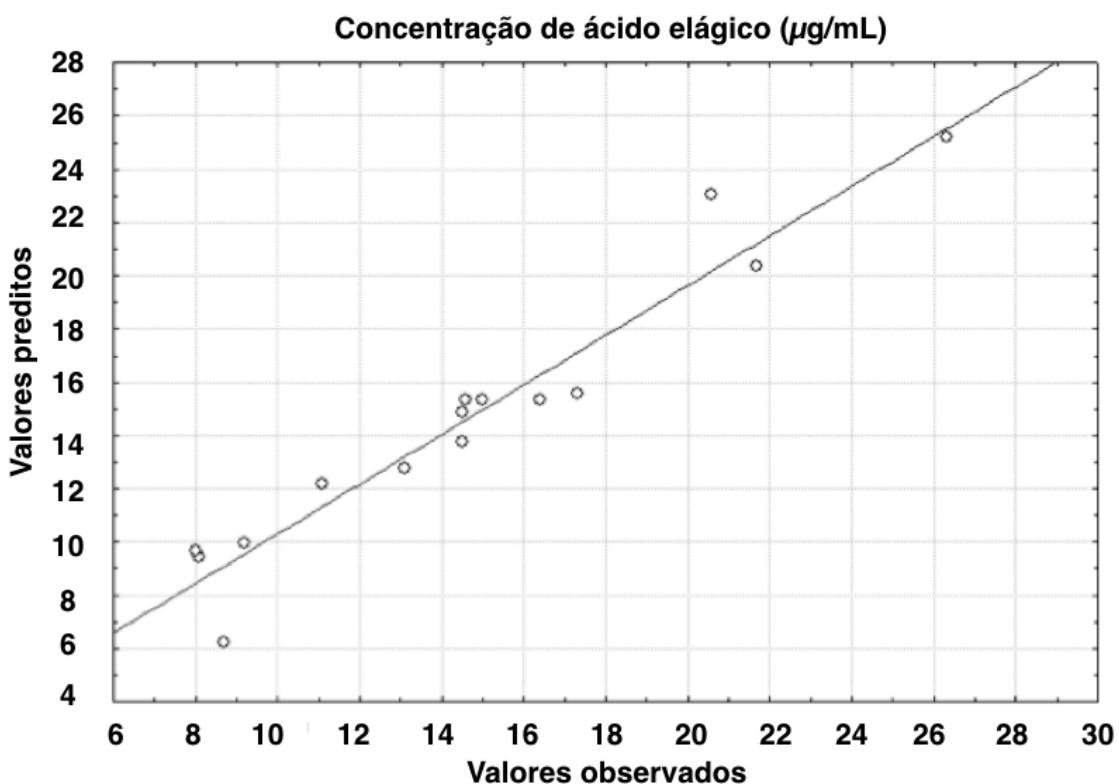
**Figura 20:** Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) das folhas de *Eugenia uniflora* L.



Legenda: (A) tempo de extração (min) e teor alcoólico (%), p/p. (B) temperatura de extração (°C) e teor alcoólico (%), p/p. (C) temperatura (°C) e tempo de extração (min). Nota: concentração de ácido elágico expressa em  $\mu\text{g/mL}$  da solução final injetada em CLAE.

A Figura 21 demonstra a relação entre os valores preditos pelo modelo e os dados observados. A proximidade destes resultados representa a adequabilidade do modelo em prever respostas.

**Figura 21:** Correlação entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo para a concentração de ácido elágico ( $\mu\text{g/mL}$ ).



Baseado na análise dos dados de superfície de resposta e na função geral de otimização, foram determinadas as condições de EAU para a otimização da resposta. O objetivo era de se obter as maiores concentrações de ácido elágico por meio da metodologia de extração. Desta forma foram sugeridos os seguintes parâmetros de extração: grau alcoólico de 44% (p/p), tempo de extração de 22 minutos e temperatura de 59°C, para um valor de 26,0  $\mu\text{g/mL}$  de ácido elágico predito pelo modelo estatístico. Essas condições foram verificadas a partir de extrações conduzidas em triplicata. Foi encontrado um valor médio de 24,0  $\mu\text{g/mL}$  de ácido elágico, correspondente a  $93,7\% \pm 0,4$  do valor predito (Tabela 19).

**Tabela 19:** Parâmetros da EAU otimizados e valores preditos e real de ácido elágico.

| Variáveis Independentes<br>Otimizadas | Valores | Valor Preditivo de<br>Ácido elágico<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Valor real de<br>Ácido elágico<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------------------------------|---------|---|--|
| Grau Alcoólico (%)                    | 44      |   |  |
| Tempo de Extração (Minutos)           | 22      | 26,0  | $24,0 \pm 0,4$   |
| Temperatura de Extração (°C)          | 59      |   |  |

Nota: concentração de ácido elágico expressa em  $\mu\text{g/mL}$  da solução final injetada em CLAE.

#### 4.6.2. Obtenção do Extrato Líquido

Apesar de a EAU e a percolação apresentarem mecanismos de extração distintos, a função e a seletividade da solução extratora permanece a mesma. Assim, os dados obtidos sobre grau alcoólico, na otimização da EAU, foram parâmetros norteadores para a obtenção do extrato líquido em maior escala. Desta forma a graduação alcoólica de 44% (p/p) foi utilizada durante o processo de extração por percolação. Foram obtidos cerca de 18 litros de extrato hidroalcoólico percolado, o material foi acondicionado em recipientes com proteção a luminosidade e acondicionados a temperatura de -20 °C. Após a rotaevaporação foram obtidos cerca de 6 litros do extrato, que por sua vez foram armazenados em frascos âmbar e mantidos a -20°C até ser realizada a caracterização e secagem do material.

#### 4.6.3. Caracterização do extrato líquido

A Tabela 20 demonstra os resultados dos testes de caracterização do extrato líquido. Foi encontrado um valor médio de  $6,46\% \pm 0,12$  de sólidos totais, um pH de  $4,79 \pm 0,05$  e densidade de  $1,0134 \text{ g/mL} \pm 1,01$ .

**Tabela 20:** Caracterização do extrato líquido das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| Replicata     | Sólidos Totais (% p/p) | pH   | Densidade (g/mL) |
|---------------|------------------------|------|------------------|
| 1             | 6,33                   | 4,85 | 1,0129           |
| 2             | 6,46                   | 4,76 | 1,0140           |
| 3             | 6,58                   | 4,77 | 1,0134           |
| Média         | 6,46                   | 4,79 | 1,0134           |
| Desvio padrão | 0,12                   | 0,05 | 0,0005           |
| DPR           | 1,94                   | 1,03 | 0,0526           |

Legenda: DPR – desvio padrão relativo.

Segundo Oliveira e Petrovick (2009), a concentração de sólidos presente no extrato líquido exerce grande impacto sobre a eficiência da operação de secagem. Desta forma extratos com conteúdo de sólidos menores tendem a formar partículas com maior espaço interno e paredes menos espessas após a secagem. O valor médio de sólidos totais encontrado no presente estudo se mostrou superior aos de Caliskan & Dirim (2013) e Gallo et al. (2011).

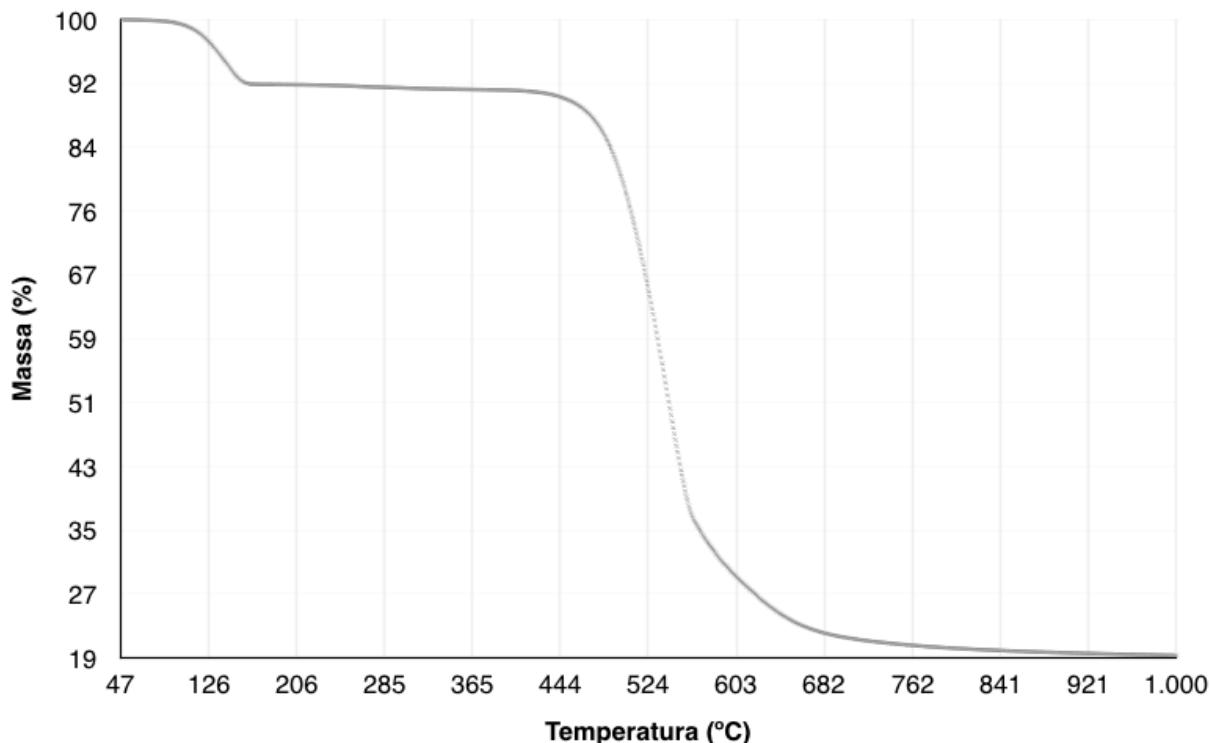
O pH do extrato líquido se mostrou em conformidade com outros trabalhos que envolveram a utilização do mesmo gênero *Eugenia* (COUTO et al., 2011 e COUTO el al., 2013). A acidez pode ser justificada pela presença de diversos compostos de natureza ácida como o próprio ácido elágico além de outros elagitaninos já relatados na literatura para a espécie de *E. uniflora* (LEE et al., 1997).

#### 4.7. Obtenção e caracterização do extrato seco das folhas de *E. uniflora*

##### 4.7.1. Análise termogravimétrica (ATG) do padrão de ácido elágico

A curva de decaimento de massa do padrão de ácido elágico frente a temperatura é demonstrada na Figura 22. É possível observar um decaimento inicial de massa pela desidratação do padrão que se estabiliza em  $91,7\% \pm 0,40$  entre as temperaturas de 164°C e 444°C. A degradação do ácido elágico teve início em torno de 444°C e se estabilizou novamente em aproximadamente 710°C.

**Figura 22:** Curva termogravimétrica do padrão ácido elágico



A ATG demonstrou a segurança na utilização de temperaturas até aproximadamente 444°C sem que ocorra a degradação do ácido elágico. Dados semelhantes foram encontrados

em outros trabalhos (ARULMOZHI, PANDIAN & MIRUNALINI, 2013; HUSSEIN et al., 2011). Este dado é importante durante o processo de secagem visando a manutenção do marcador no extrato.

#### 4.7.2. Delineamento experimental

Com base na literatura foram selecionados parâmetros a se avaliar para otimização das condições de secagem por aspersão do extrato líquido. Segundo Couto et al. (2011) a maior parte dos trabalhos envolvendo secagem por aspersão (*Spray Drying*) faz utilização da técnica com o auxílio de adjuvantes de secagem, para aplicação na área de alimentos, sendo cada vez mais necessário o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas para a utilização destes materiais na área farmacêutica. Para a secagem de extratos derivados de plantas, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *Spray Drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e qualidade do material, podendo afetar até mesmo características como a biodisponibilidade (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Adjuvantes de secagem geralmente são adicionados ao processo com o intuito de se melhorar a eficiência de secagem e propriedades do produto (GEORGETTI et al., 2008). O dióxido de silício coloidal (Aerosil®) tem sido amplamente empregado como adjuvante em processos de secagem por aspersão, por ser considerado de elevada superfície específica e alto poder sorvente (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). Com o foco mais voltado para a indústria de alimentos, outros adjuvantes são amplamente utilizados, como a maltodextrina e ciclodextrina, o manitol, a celulose microcristalina e a goma arábica, entretanto, vários estudos demonstraram a superioridade do Aerosil® sobre características como: rendimento do processo de secagem; tamanho de partícula e escoamento do material (GALLO el al., 2011; CORTÉS-ROJAS, SOUZA & OLIVEIRA, 2015; VASCONCELOS, MEDEIROS & MOURA, 2005 e GEORGETTI et al., 2008).

A temperatura de saída do extrato seco é um resultado da temperatura de entrada e da vazão do extrato durante o processo de secagem por aspersão. Ela apresenta impacto direto sobre a degradação química dos constituintes do extrato líquido e a umidade e atividade de água (AW) do extrato seco (CORTÉS-ROJAS, SOUZA & OLIVEIRA, 2015). Desta forma a temperatura de entrada, a vazão do extrato e a concentração do adjuvante foram as variáveis independentes selecionadas para o estudo de otimização.

Foram realizadas três secagens preliminares do extrato a fim de se avaliar o efeito da concentração do adjuvante sobre o rendimento e as características do extrato seco. A Tabela

21 apresenta a concentração utilizada de adjuvante em cada uma das três secagens e os resultados obtidos para rendimento e caracterização do extrato.

**Tabela 21:** Rendimento e caracterização do extrato obtido com o método de secagem do estudo preliminar para a avaliação de três concentrações do adjuvante (Aerosil®).

| % (p/p)* de adjuvante | Rendimento (%) | Umidade (%) | AW     | Teor de ácido elágico (%) |
|-----------------------|----------------|-------------|--------|---------------------------|
| 0                     | 56,10          | 4,89        | 0,2857 | 0,8786                    |
| 5                     | 59,79          | 4,82        | 0,2853 | 0,7459                    |
| 20                    | 59,98          | 4,28        | 0,2463 | 0,7715                    |

**Legenda:** AW – atividade de água. \*porcentagem de aerosil® em relação a massa de sólidos totais. Condições de secagem: diâmetro do bico de aspersão de 1,2 mm, fluxo do ar comprimido de 40 L/min., pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F, fluxo do ar de secagem de 3,0 m<sup>3</sup>/min., temperatura de entrada de 125°C e vazão do extrato de 4,0 mL/min.

Foi possível observar o comportamento do rendimento da secagem, sendo este, diretamente proporcional a concentração do adjuvante. Para as demais avaliações (umidade, atividade de água e teor de ácido elágico) este comportamento foi inversamente proporcional a concentração do adjuvante. Desta forma estas informações foram exploradas com maior detalhamento durante o estudo de otimização da secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*).

#### 4.7.3. Otimização da secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*)

Os resultados dos 15 experimentos na matriz do modelo experimental Box Behnken (3<sup>3</sup>), é apresentada na Tabela 22.

**Tabela 22:** Matriz experimental do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (*Spray Drying*).

| Nº | Temperatura de entrada (°C) | Vazão do Extrato (mL/min.) | Concentração do Adjuvante (% p/p)* | Rendimento (%) | Umidade (%) | AW     | Teor de Ácido elágico (%) |
|----|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------|-------------|--------|---------------------------|
| 1  | 120                         | 3                          | 10                                 | 54,62          | 3,15        | 0,2053 | 0,7639                    |
| 2  | 160                         | 3                          | 10                                 | 56,47          | 3,04        | 0,1517 | 0,7472                    |
| 3  | 120                         | 5                          | 10                                 | 54,06          | 3,92        | 0,2230 | 0,8074                    |
| 4  | 160                         | 5                          | 10                                 | 53,86          | 2,94        | 0,1887 | 0,7564                    |
| 5  | 120                         | 4                          | 0                                  | 47,45          | 4,33        | 0,2523 | 0,8114                    |
| 6  | 160                         | 4                          | 0                                  | 44,88          | 4,02        | 0,2587 | 0,8042                    |
| 7  | 120                         | 4                          | 20                                 | 56,01          | 2,68        | 0,1923 | 0,8896                    |
| 8  | 160                         | 4                          | 20                                 | 54,45          | 3,20        | 0,1740 | 0,8468                    |
| 9  | 140                         | 3                          | 0                                  | 48,30          | 3,79        | 0,1663 | 0,9261                    |
| 10 | 140                         | 5                          | 0                                  | 46,13          | 4,22        | 0,1700 | 0,9088                    |
| 11 | 140                         | 3                          | 20                                 | 56,14          | 3,02        | 0,1780 | 0,6728                    |
| 12 | 140                         | 5                          | 20                                 | 56,77          | 3,29        | 0,1910 | 0,7408                    |
| 13 | 140                         | 4                          | 10                                 | 56,50          | 3,54        | 0,2107 | 0,7401                    |
| 14 | 140                         | 4                          | 10                                 | 52,66          | 3,44        | 0,2010 | 0,7200                    |
| 15 | 140                         | 4                          | 10                                 | 56,05          | 3,63        | 0,1870 | 0,7722                    |

Legenda: AW – atividade de água. \*porcentagem de aerosil® em relação a massa de sólidos totais. Condições mantidas fixas durante a secagem: diâmetro do bico de aspersão de 1,2 mm, fluxo do ar comprimido de 40 L/min., pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F, fluxo do ar de secagem de 3,0 m<sup>3</sup>/min.

A análise de variância com o sumário dos efeitos das variáveis independentes e sua significância são apresentados na Tabela 23. Com exceção das interações entre temperatura de entrada e vazão do extrato, e a interação entre temperatura de entrada e concentração do adjuvante, na avaliação da umidade, as demais variáveis independentes não demonstraram efeitos significativos em suas interações.

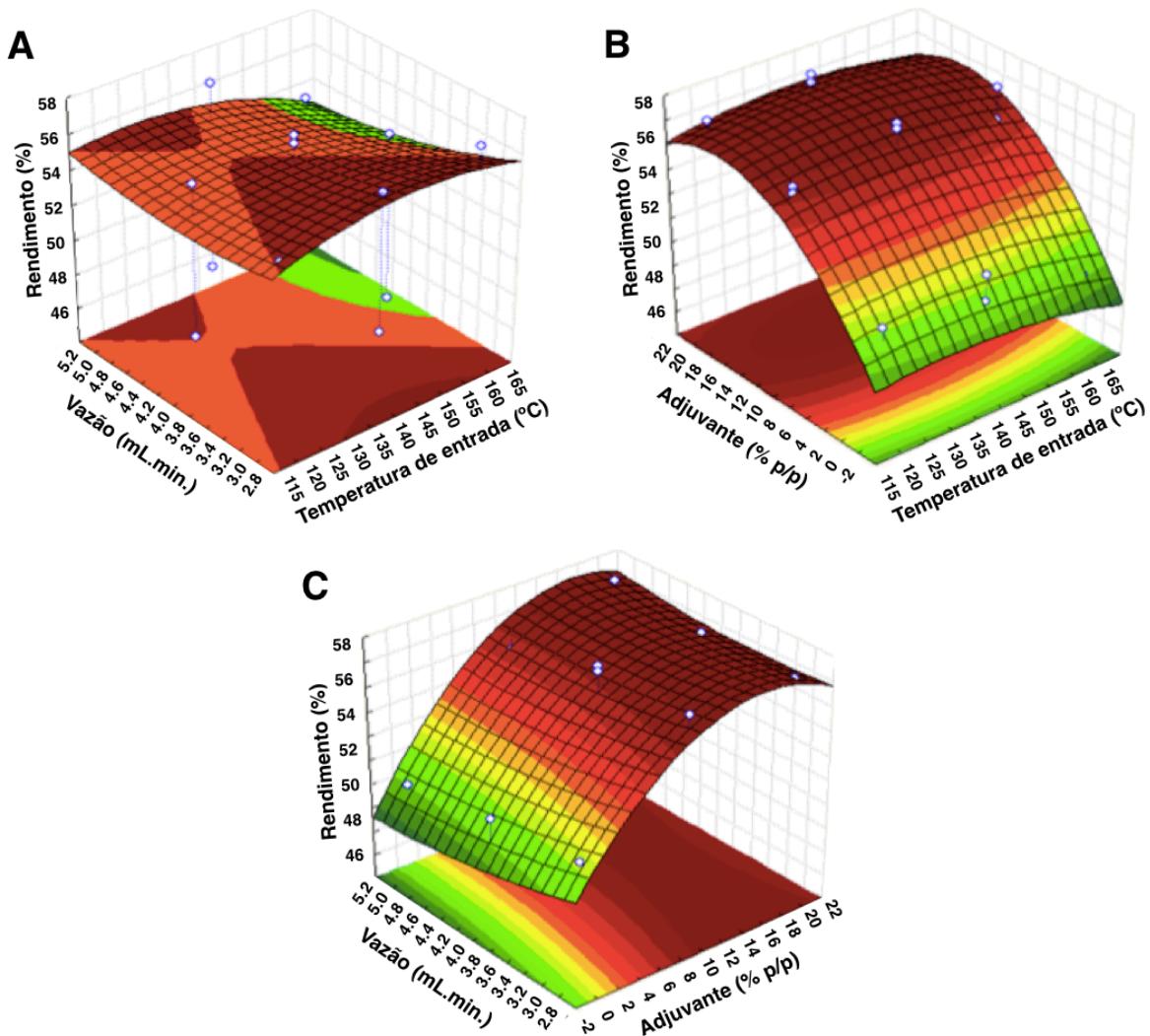
**Tabela 23:** Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no planejamento Box Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| <b>Parâmetro</b> | <b>Rendimento</b> |               | <b>Umidade</b> |               | <b>AW</b> |               | <b>Ácido elágico</b> |               |
|------------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|-----------|---------------|----------------------|---------------|
|                  | <b>p</b>          | <b>efeito</b> | <b>p</b>       | <b>efeito</b> | <b>p</b>  | <b>efeito</b> | <b>p</b>             | <b>efeito</b> |
| 1L               | 0,7167            | -0,6200       | 0,0815         | -0,2208       | 0,0971    | -0,0250       | 0,2579               | -0,0288       |
| 1Q               | 0,5740            | 0,7275        | 0,0951         | 0,1488        | 0,1027    | -0,0178       | 0,2245               | -0,0235       |
| 2L               | 0,5108            | -1,1775       | 0,0361*        | 0,3442        | 0,1683    | 0,0178        | 0,3066               | 0,0250        |
| 2Q               | 0,7435            | -0,4100       | 0,1239         | 0,1271        | 0,0554    | 0,0252        | 0,9556               | -0,0009       |
| 3L               | 0,0253*           | 9,1525        | 0,0041*        | -1,0417       | 0,0797    | -0,0280       | 0,0287*              | -0,1062       |
| 3Q               | 0,0793            | 3,6450        | 0,0776         | -0,1671       | 0,7803    | -0,0020       | 0,0465*              | -0,0606       |
| 1L e 2L          | 0,6736            | -1,0250       | 0,0439*        | -0,4383       | 0,5019    | 0,0097        | 0,5805               | -0,0170       |
| 1L e 3L          | 0,8323            | 0,5050        | 0,0483*        | 0,4167        | 0,4089    | -0,0123       | 0,5814               | -0,0170       |
| 2L e 3L          | 0,0832            | 1,4000        | 0,4886         | -0,0800       | 0,7328    | 0,0047        | 0,2537               | 0,0413        |
| Falta de ajuste  | 0,8025            | -             | 0,0877         | -             | 0,0819    | -             | 0,0553               | -             |

Legenda: AW – atividade de água. 1 – temperatura de entrada, 2 – vazão do extrato, 3 – concentração do adjuvante. L – linear, Q – quadrático. \* $p<0,05$ .

O rendimento da secagem foi influenciado significativamente pela concentração de adjuvante, de forma que, o aumento da concentração de adjuvante no extrato favoreceu um maior rendimento. Nos níveis avaliados os gráficos de superfície de resposta demonstram um platô em função da temperatura de entrada e da vazão do extrato sugerindo que estas variáveis não afetariam esta resposta nessas condições (Figura 23). O modelo apresentou significância estatística sem demonstrar falta de ajuste ( $p = 0,000134$  e  $0,802473$  respectivamente). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9443.

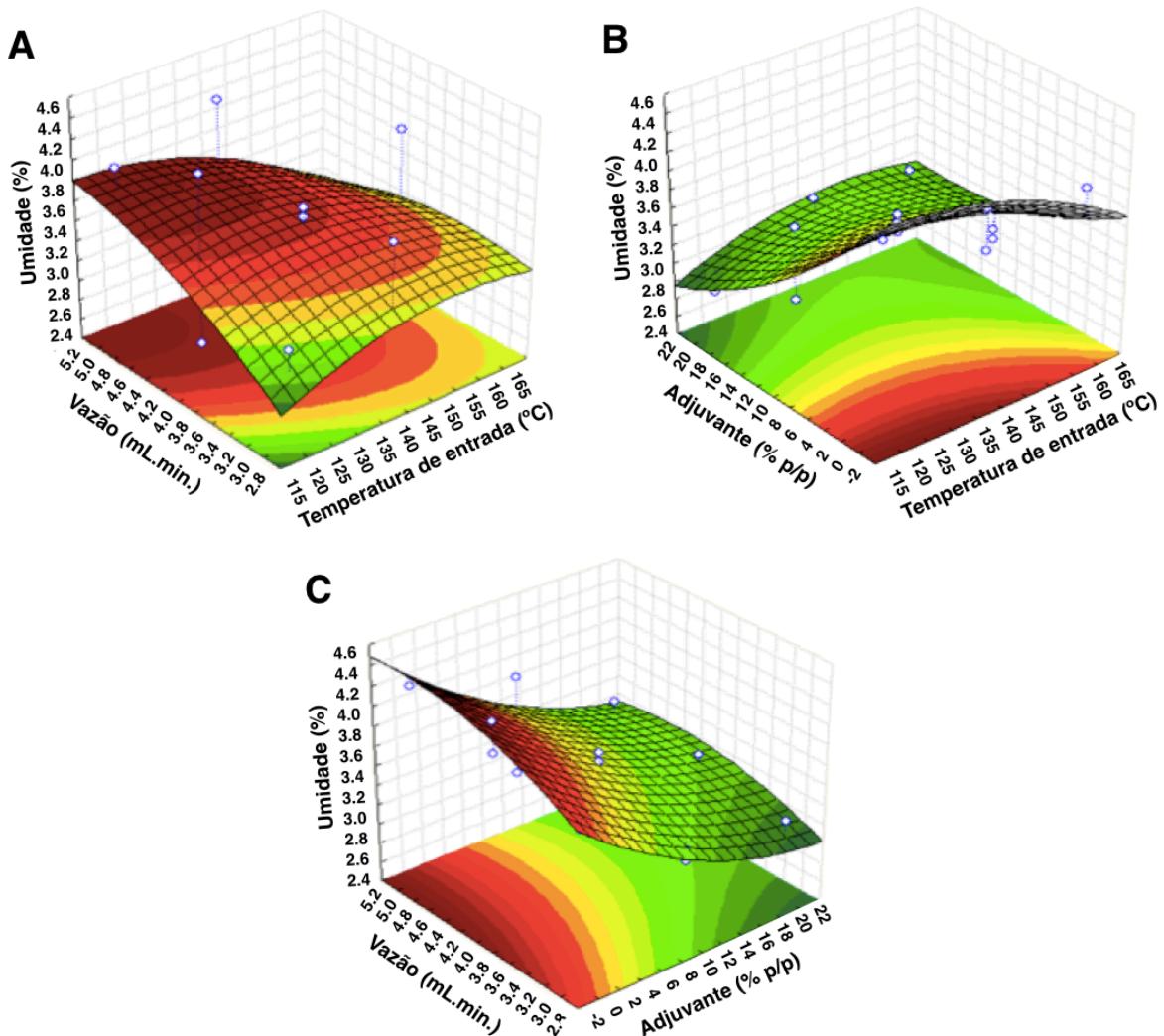
**Figura 23:** Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.



Legenda: (A) vazão do extrato (mL/min.) e temperatura de entrada (°C). (B) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). (C) vazão do extrato (mL/min.) e concentração do adjuvante (% p/p). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Os gráficos de superfície de resposta para as avaliações de umidade e atividade de água (AW) devem ser avaliados de forma que as condições de maior desejabilidade sejam aquelas com os menores valores de resposta (representados na cor verde). A vazão do extrato apresentou efeito linear positivo sobre a umidade dos extratos secos. Também foram consideradas significativas as interações entre temperatura de entrada e vazão do extrato e a interação entre temperatura de entrada e concentração de adjuvante (Figura 24). O modelo para avaliação da umidade apresentou valor de  $p$  de 0,000063, não demonstrando falta de ajuste ( $p = 0,087678$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9115.

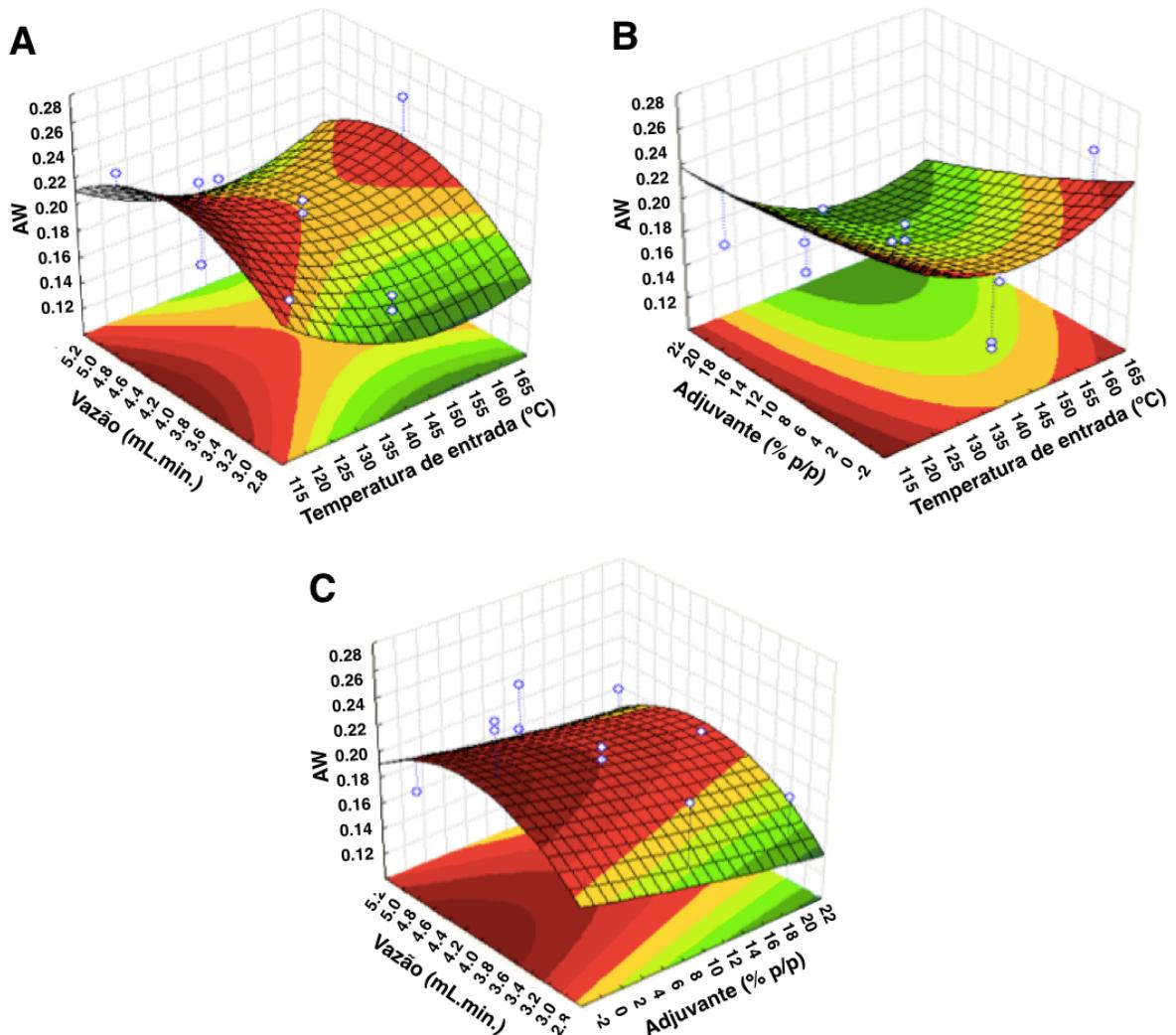
**Figura 24:** Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.



Legenda: (A) vazão do extrato (mL/min.) e temperatura de entrada (°C). (B) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). (C) vazão do extrato (mL/min.) e concentração do adjuvante (% p/p). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Para a atividade de água (AW) o modelo apresentou significância sem demonstrar falta de ajuste ( $p = 0,000307$  e  $0,081860$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,5956. Não foi possível a identificação de efeitos significativos das variáveis independentes sobre a atividade de água (AW). Utilizando um menor critério estatístico de significância (10%) é possível identificar alguns efeitos significativos, entretanto pelo mesmo critério o modelo demonstraria falta de ajuste. Os gráficos de superfície de resposta das interações são demonstrados nas Figura 25.

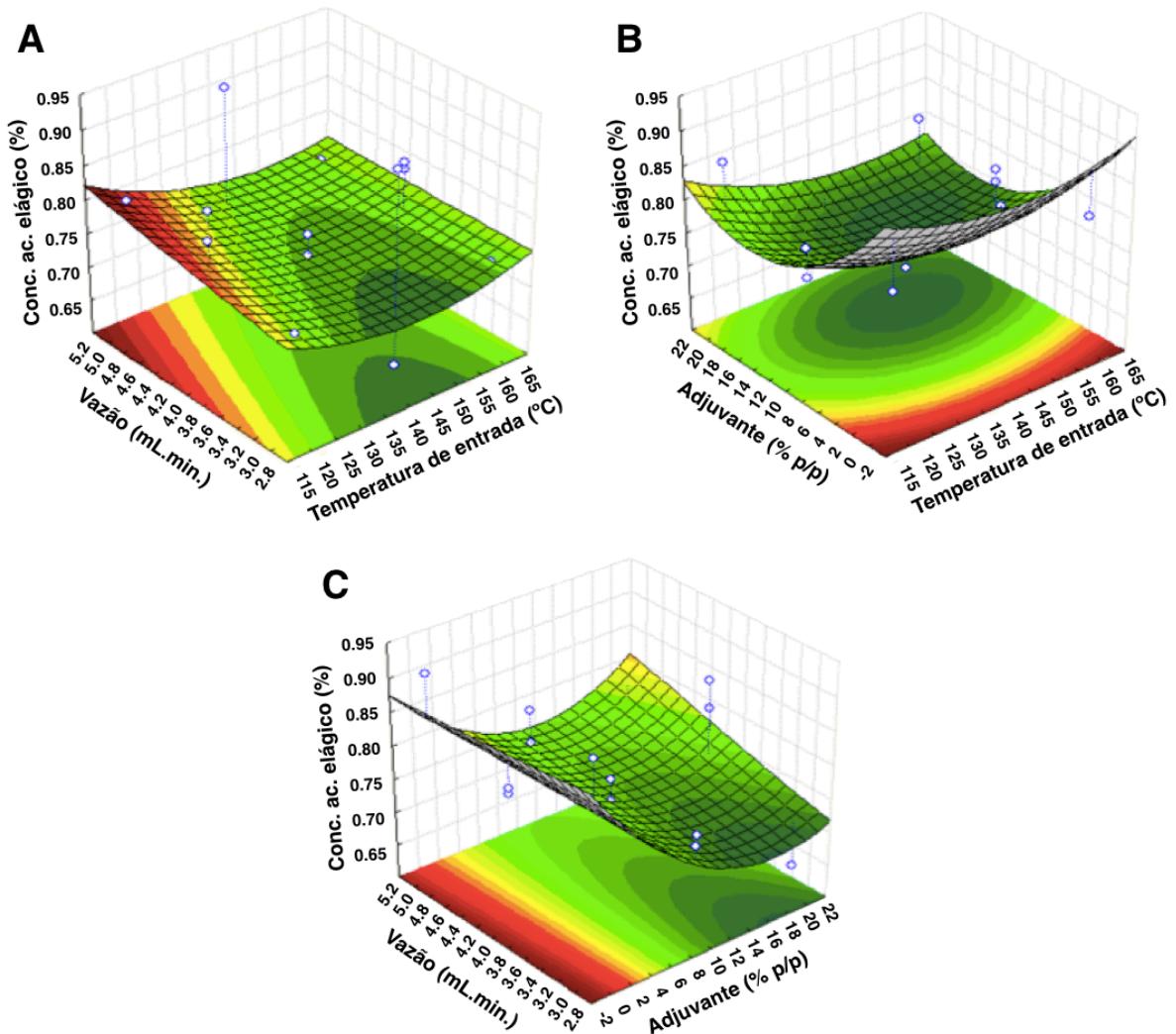
**Figura 25:** Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.



Legenda: (A) vazão do extrato (mL/min.) e temperatura de entrada (°C). (B) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). (C) vazão do extrato (mL/min.) e concentração do adjuvante (% p/p). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Não foram identificadas interações significativas entre as variáveis independentes para o teor de ácido elágico (%), entretanto foram significativos os efeitos lineares e quadráticos da concentração de adjuvante para essa resposta. Os gráficos de superfície de resposta demonstram que menores concentrações de adjuvante estavam associadas aos maiores teores de ácido elágico, conforme demostrado nas Figura 26. O modelo apresentou valor de  $p$  de 0,0000090 não demonstrando falta de ajuste ( $p = 0,055270$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,5399.

**Figura 26:** Gráficos de superfície de resposta representando o teor de ácido elágico (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.

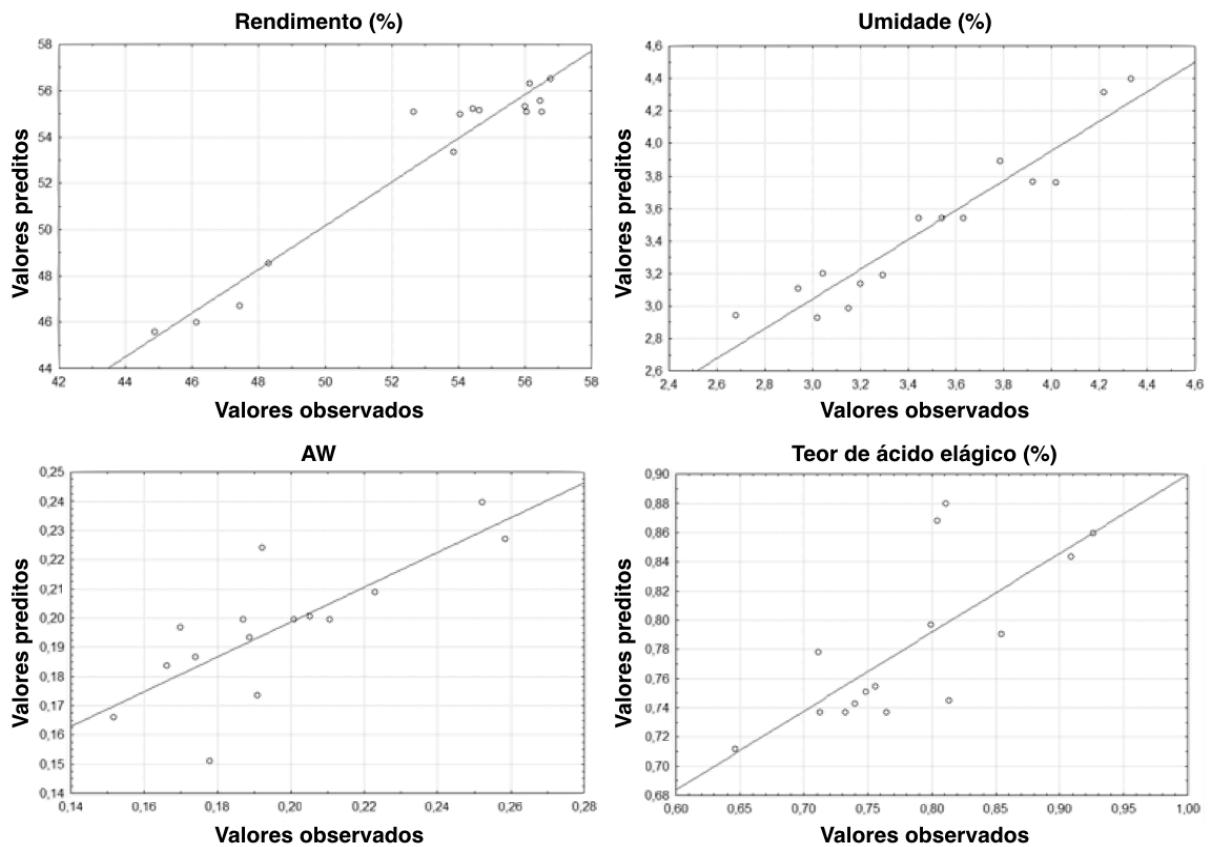


Legenda: (A) vazão do extrato (mL/min.) e temperatura de entrada (°C). (B) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). (C) vazão do extrato (mL/min.) e concentração do adjuvante (% p/p). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Com base na avaliação dos gráficos de superfície de resposta é possível concluir que nos níveis estudados, as variáveis temperatura de entrada e vazão do extrato não apresentaram interferência sobre o teor de ácido elágico.

A Figura 27 apresenta os gráficos de correlação entre os valores preditos pelo modelo e os observados por meio da experimentação. Mais uma vez a proximidade destes valores indica a capacidade do modelo em prever as respostas para cada uma das variáveis respondidas estudadas.

**Figura 27:** Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos.



A fim de se explorar outras regiões dos gráficos de superfície de resposta, foi proposto um segundo delineamento fatorial estudando níveis mais amplos para as mesmas variáveis independentes.

#### 4.7.3.1. Segundo delineamento fatorial

A Tabela 24 apresenta a nova matriz do modelo Box Behnken ( $3^3$ ) com os resultados do rendimento e testes de caracterização para cada um dos novos 15 extratos obtidos.

**Tabela 24:** Matriz experimental do segundo planejamento fatorial no modelo Box Behnken ( $3^3$ ) e seus respectivos resultados de rendimento e testes de caracterização dos extratos secos obtidos por aspersão (*Spray Drying*).

| Nº | Temperatura de entrada (°C) | Vazão do Extrato (mL/min.) | Concentração do Adjuvante (% p/p)* | Rendimento (%) | Umidade (%) | AW     | Teor de Ácido elágico (%) |
|----|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------|-------------|--------|---------------------------|
| 1  | 150                         | 3                          | 0                                  | 43,46          | 3,24        | 0,2153 | 0,7364                    |
| 2  | 150                         | 9                          | 0                                  | 44,43          | 3,64        | 0,2110 | 0,7264                    |
| 3  | 150                         | 3                          | 60                                 | 64,55          | 2,45        | 0,1907 | 0,7037                    |
| 4  | 150                         | 9                          | 60                                 | 69,50          | 2,66        | 0,1713 | 0,7186                    |
| 5  | 120                         | 3                          | 30                                 | 64,33          | 2,71        | 0,1997 | 0,6659                    |
| 6  | 120                         | 9                          | 30                                 | 69,43          | 2,97        | 0,1937 | 0,7221                    |
| 7  | 180                         | 3                          | 30                                 | 62,21          | 2,05        | 0,1737 | 0,7241                    |
| 8  | 180                         | 9                          | 30                                 | 65,18          | 2,35        | 0,1817 | 0,6548                    |
| 9  | 180                         | 6                          | 0                                  | 45,24          | 4,15        | 0,2537 | 0,6918                    |
| 10 | 180                         | 6                          | 60                                 | 69,49          | 3,13        | 0,1970 | 0,6922                    |
| 11 | 180                         | 6                          | 0                                  | 40,76          | 3,40        | 0,2417 | 0,6545                    |
| 12 | 180                         | 6                          | 60                                 | 65,38          | 2,28        | 0,1557 | 0,6633                    |
| 13 | 150                         | 6                          | 30                                 | 63,69          | 2,36        | 0,1570 | 0,6758                    |
| 14 | 150                         | 6                          | 30                                 | 62,39          | 2,41        | 0,1627 | 0,6930                    |
| 15 | 150                         | 6                          | 30                                 | 61,72          | 2,56        | 0,1623 | 0,6727                    |

Legenda: AW – atividade de água. \*porcentagem de aerosil® em relação a massa de sólidos totais. Condições mantidas fixas durante a secagem: diâmetro do bico de aspersão de 1,2 mm, fluxo do ar comprimido de 40 L/min., pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F, fluxo do ar de secagem de 3,0 m<sup>3</sup>/min.

A seguir são apresentados o sumário dos efeitos e os valores de *p* das avaliações lineares e quadráticas de cada uma das variáveis independentes e suas interações (Tabela 25). O modelo apresentou valor de *p* igual a 0,003063, não demonstrando significância para a falta de ajuste (*p* = 0,087678).

**Tabela 25:** Sumário dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas avaliadas no novo planejamento Box Behnken ( $3^3$ ) na obtenção do extrato seco das folhas de *Eugenia uniflora* L.

| <b>Parâmetro</b> | <b>Rendimento</b> |               | <b>Umidade</b> |               | <b>AW</b> |               | <b>Ácido elágico</b> |               |
|------------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|-----------|---------------|----------------------|---------------|
|                  | <b>p</b>          | <b>efeito</b> | <b>p</b>       | <b>efeito</b> | <b>p</b>  | <b>efeito</b> | <b>p</b>             | <b>efeito</b> |
| 1L               | 0,0342*           | -3,7397       | 0,0101*        | -0,7217       | 0,0096*   | -0,0228       | 0,1360               | -0,0188       |
| 1Q               | 0,1469            | -1,2083       | 0,0955         | -0,1610       | 0,0063*   | -0,0207       | 0,0829               | 0,0285        |
| 2L               | 0,0388*           | 3,4973        | 0,0566         | 0,2933        | 0,1374    | -0,0054       | 0,6147               | -0,0046       |
| 2Q               | 0,1055            | -1,4783       | 0,2645         | 0,0824        | 0,0729    | -0,0058       | 0,0348*              | -0,0298       |
| 3L               | 0,0009*           | 23,7572       | 0,0055*        | -0,9816       | 0,0019*   | -0,0518       | 0,3142               | -0,0103       |
| 3Q               | 0,0037*           | 8,5947        | 0,0010*        | -0,6376       | 0,0029*   | -0,0306       | 0,1419               | -0,0135       |
| 2L e 3L          | 0,1855            | 1,9938        | 0,4541         | -0,0950       | 0,1410    | -0,0076       | 0,2523               | 0,0175        |
| 2L e 1L          | 0,4015            | -1,0609       | 0,0853         | 0,0217        | 0,1588    | 0,0070        | 0,0291*              | -0,0628       |
| 3L e 1L          | 0,8724            | 0,1827        | 0,6661         | -0,0517       | 0,0441*   | -0,0147       | 0,7326               | 0,0043        |
| Falta de ajuste  | 0,6347            | -             | 0,5461         | -             | 0,0335    | -             | 0,3083               | -             |

Legenda: AW – atividade de água. 1 – temperatura de entrada, 2 – vazão do extrato, 3 – concentração do adjuvante. L – linear, Q – quadrático. \*  $p < 0,05$ .

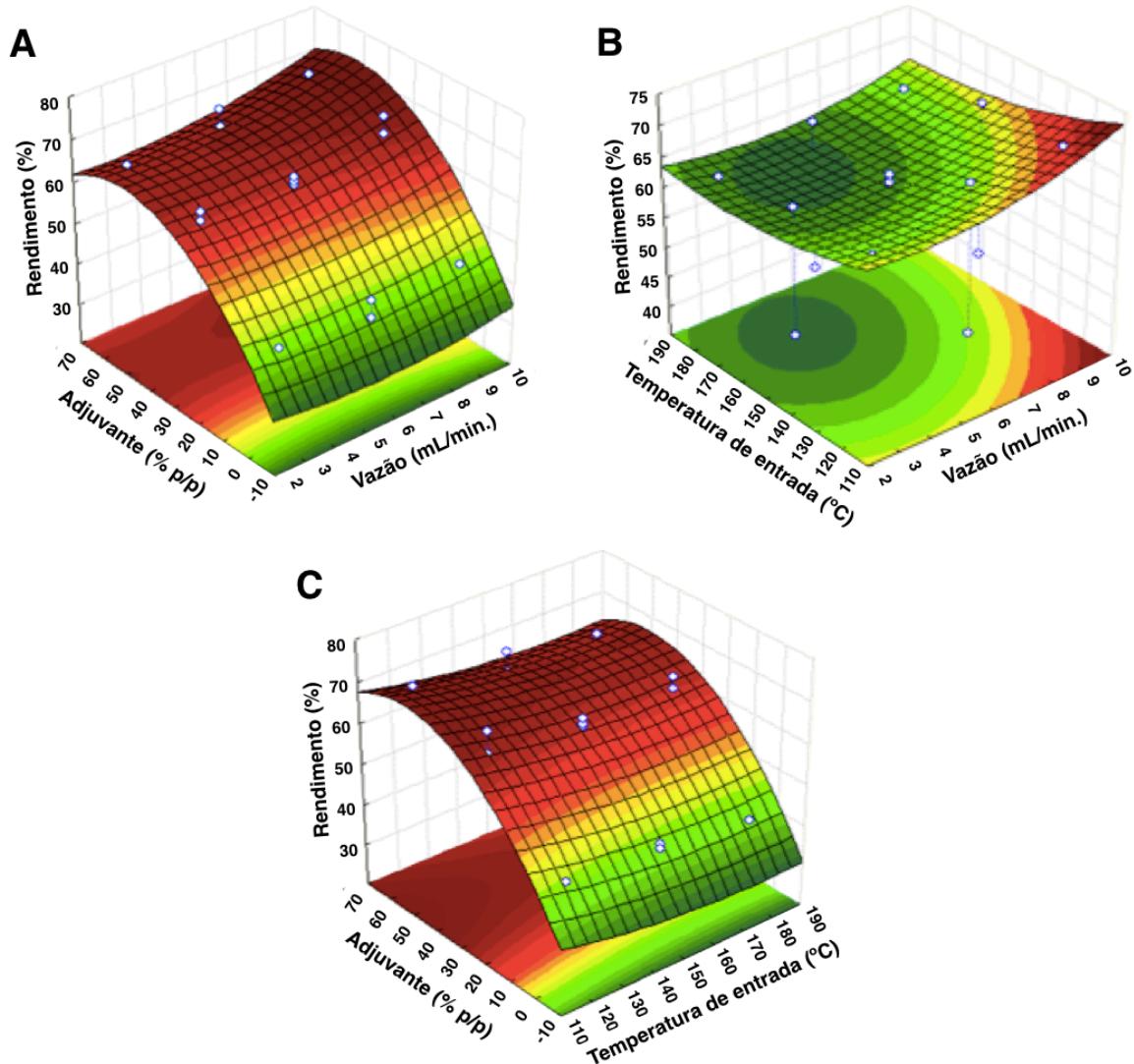
Ao longo dos 15 experimentos o rendimento da secagem variou entre 40,76 e 69,50% em relação ao total de sólidos presentes no material de entrada. As três variáveis independentes demonstraram efeito linear significativo sobre a resposta. A variável que mais influenciou o rendimento foi a concentração de adjuvante (efecto apresentado na Tabela 25). Vasconcelo et al. (2005), reportaram efeito semelhante no rendimento para a secagem de extratos líquidos obtidos das cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Os autores chegaram a encontrar diferenças maiores que 100% entre os rendimentos das secagens do planejamento fatorial, sendo que ao final do experimento a maior concentração avaliada de Aerosil® foi adotada para os parâmetros otimizados.

A temperatura de entrada apresentou efeito negativo e a vazão do extrato apresentou efeito positivo sobre o rendimento (Tabela 25). A interpretação destes dados indica que temperaturas de saída mais baixas, resultado de baixas temperaturas de entrada e altas vazões do extrato, estão relacionadas com maiores rendimentos. Entretanto, segundo Oliveira e Petrovick (2009), temperaturas de entrada mais elevadas facilitam o processo de secagem, pois normalmente reduzem a tensão superficial e a viscosidade do material, facilitando a formação de gotículas.

A Figura 28 mostra o comportamento do rendimento da secagem frente a interações das variáveis independentes. Assim como observado nos resultados do primeiro delineamento fatorial, houve a formação de platôs em função das variáveis temperatura de entrada e vazão do extrato. A identificação de platôs nos gráficos de superfície de resposta indica que nos níveis adotados a variável em questão não afeta a resposta estudada (BEZERRA et al., 2008).

O modelo demonstrou significância estatística sem apresentar falta de ajuste ( $p = 0,000024$  e  $0,634678$  respectivamente). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de  $0,9972$ .

**Figura 28:** Gráficos de superfície de resposta representando o rendimento da secagem (%) em função das variáveis independentes.



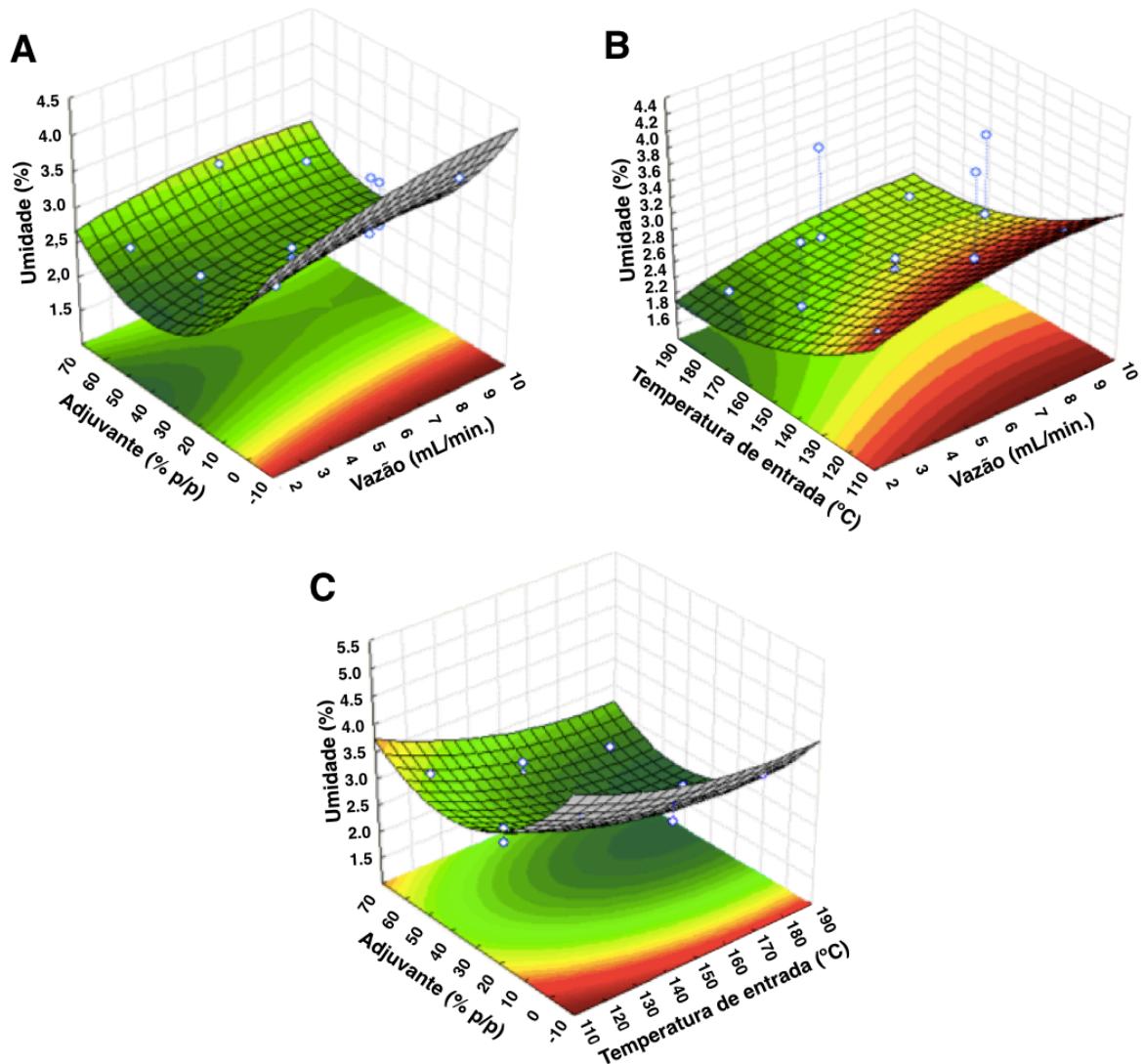
Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p) e vazão do extrato (mL/min.). (B) temperatura de entrada (°C) e vazão do extrato (mL/min.). (C) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

O impacto positivo da utilização de adjuvantes sobre o rendimento dos extratos secos, (em especial o dióxido de silício coloidal - Aerosil®), já foi apontado em outros estudos de otimização (CORTÉS-ROJAS, SOUZA & OLIVEIRA, 2015; e GEORGETTI et al., 2008; GALLO el al., 2011; VASCONCELOS & MOURA, 2005).

Visando a minimização da resposta umidade, a análise de variância (Tabela 25) indicou que as variáveis temperatura de entrada e concentração de adjuvante foram

significativas na modificação desta resposta ao longo dos experimentos. Os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 29 demonstram que no intervalo avaliado a vazão do extrato apresentou pouco impacto sobre o teor de umidade dos extratos secos. O modelo apresentou valor de  $p$  de 0,000104, sem demonstrar falta de ajuste ( $p = 0,546083$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9892.

**Figura 29:** Gráficos de superfície de resposta representando a umidade (%) do extrato seco em função das variáveis independentes.



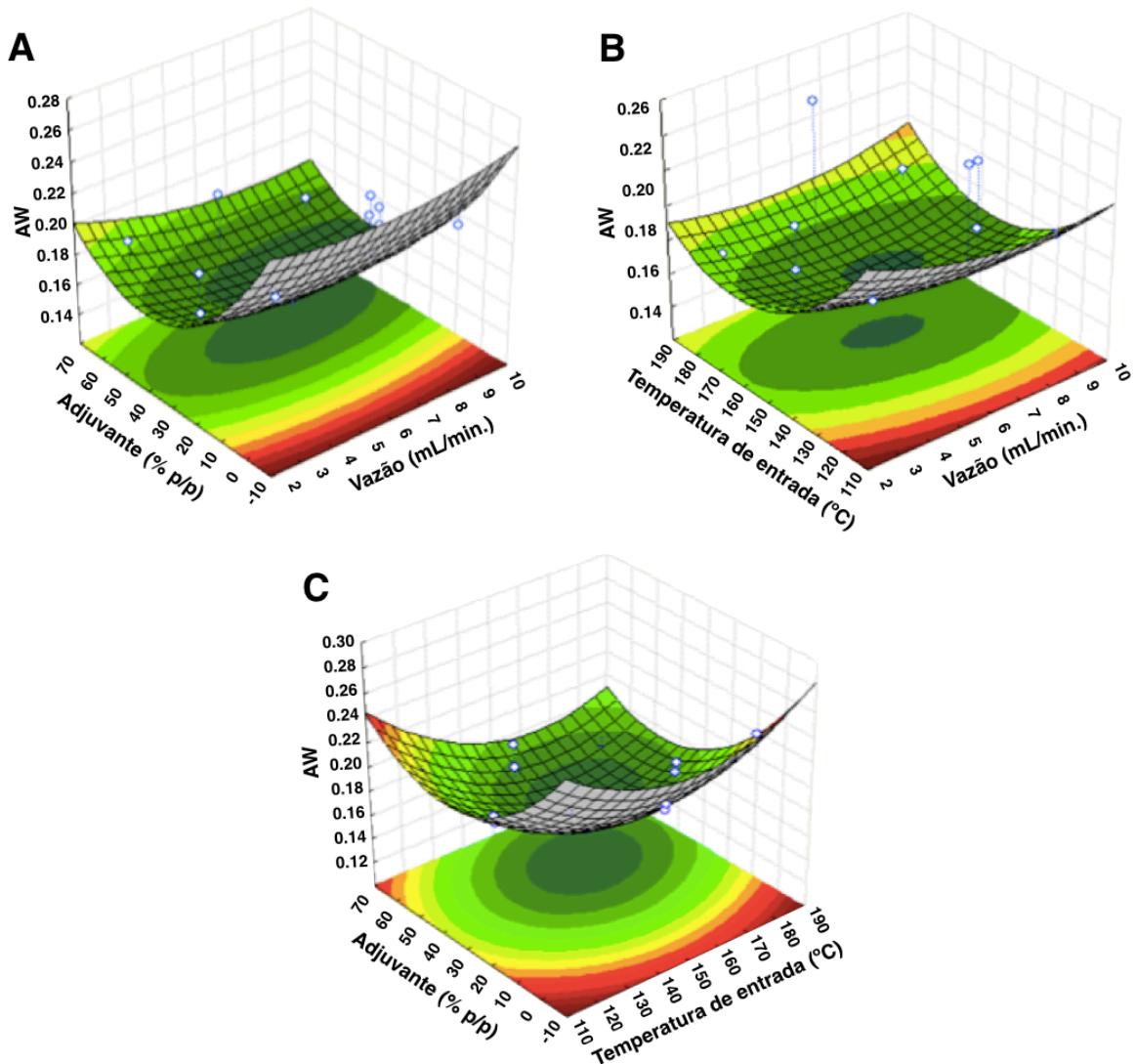
Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p) e vazão do extrato (mL/min.). (B) temperatura de entrada (°C) e vazão do extrato (mL/min.). (C) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Segundo Kurozawa et al. (2009) com altas temperaturas do ar de entrada existe uma maior transferência de calor para as partículas atomizadas ocorrendo desta forma uma maior taxa de evaporação dos solventes. Por outro lado, a altas vazões do extrato implicariam em

um menor período de contato entre o material atomizado e o ar de secagem resultando em uma menor evaporação do solvente.

A atividade de água (AW) é considerada um dos fatores de qualidade mais importantes quanto se trata do período de estocagem do material seco (CALISKAN & DIRIM, 2013). Assim como na avaliação da umidade, foram objetivados os valores mais baixos. O modelo demonstrou significância estatística entretanto a avaliação da falta de ajuste também foi significativa ( $p = 0,000021$  e  $0,033540$ ). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9274. Os gráficos de superfície de resposta, apresentados na Figura 30, mostram que a variável independente com menor influência sobre a atividade de água foi a vazão do extrato. Como a atividade de água e a umidade são respostas relacionadas este comportamento já era esperado.

**Figura 30:** Gráficos de superfície de resposta representando a atividade de água (AW) do extrato seco em função das variáveis independentes.



Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p) e vazão do extrato (mL/min.). (B) temperatura de entrada (°C) e vazão do extrato (mL/min.). (C) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

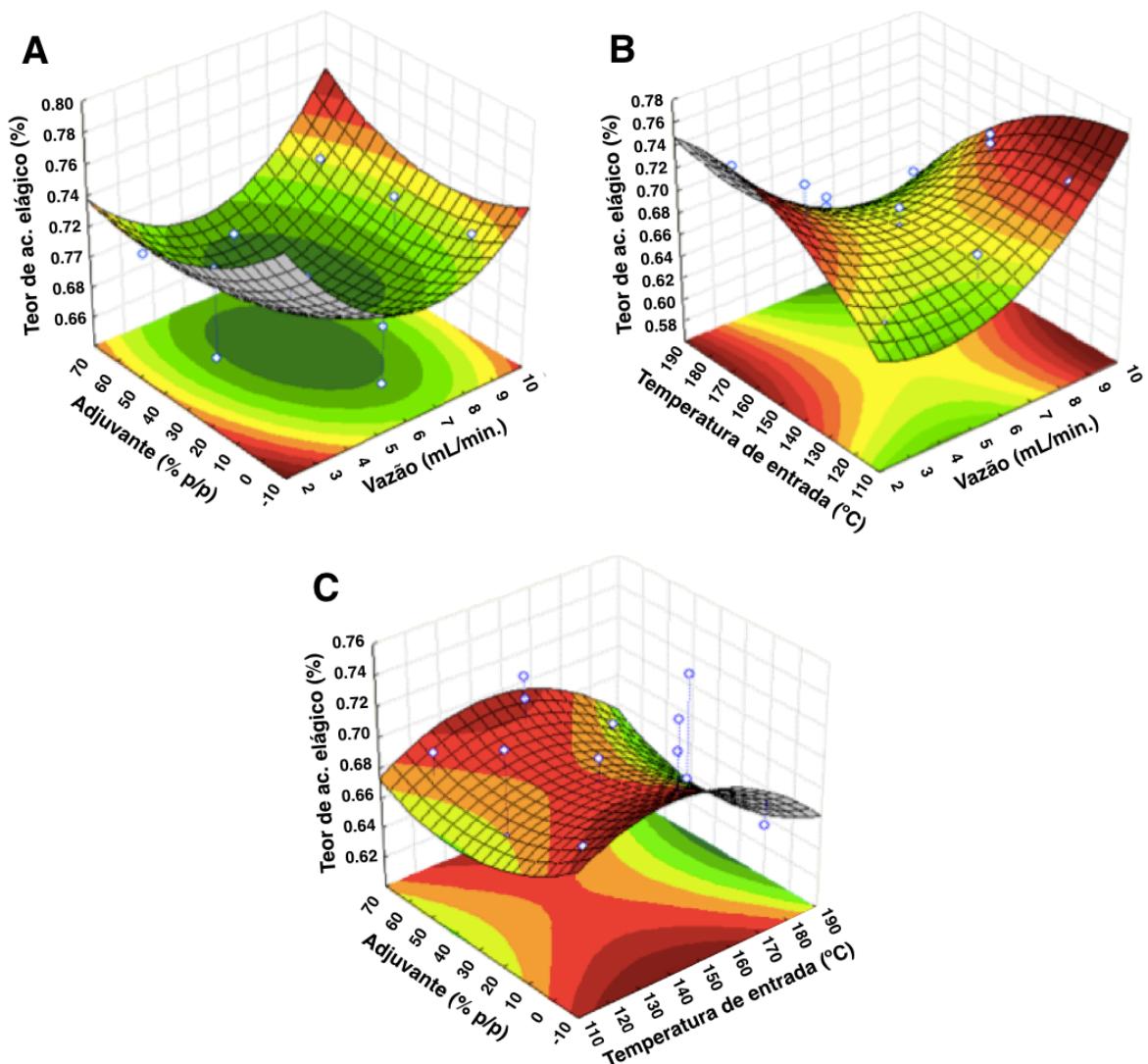
Nos três gráficos de superfície de resposta apresentados para avaliação da influência dos parâmetros de secagem sobre a atividade de água é possível verificar os pontos de mínimos valores, indicados pela coloração verde mais intensa, localizados dentro da região do experimento.

Em todos os experimentos os valores de atividade de água encontrados variaram entre 0,1557 e 0,2537. Considerando que valores abaixo de 0,6 proporcionam estabilidade microbiológica e entre 0,2 e 0,4 garante a estabilidade quanto a hidrólise, oxidação lipídica, auto-oxidação e atividade enzimática, concluímos que todos os extratos obtidos apresentaram

atividade de água adequada como parâmetro de qualidade (QUEL, CHOK & SWEDLUND, 2007; MARQUES, FERREIRA & FREIRE, 2007).

Os teores de ácido elágico para os 15 experimentos variaram entre 0,6545 e 0,7364%. A análise de variância e de regressão linear demonstrou uma interação significativa entre a temperatura de entrada e a vazão do extrato. O modelo apresentou valor de  $p$  de 0,000021 sem demonstrar falta de ajuste ( $p = 0,308332$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9067 . Os gráficos de superfície de resposta são apresentados na Figura 31.

**Figura 31:** Gráficos de superfície de resposta representando o teor de ácido elágico (%) presente no extrato seco em função das variáveis independentes.

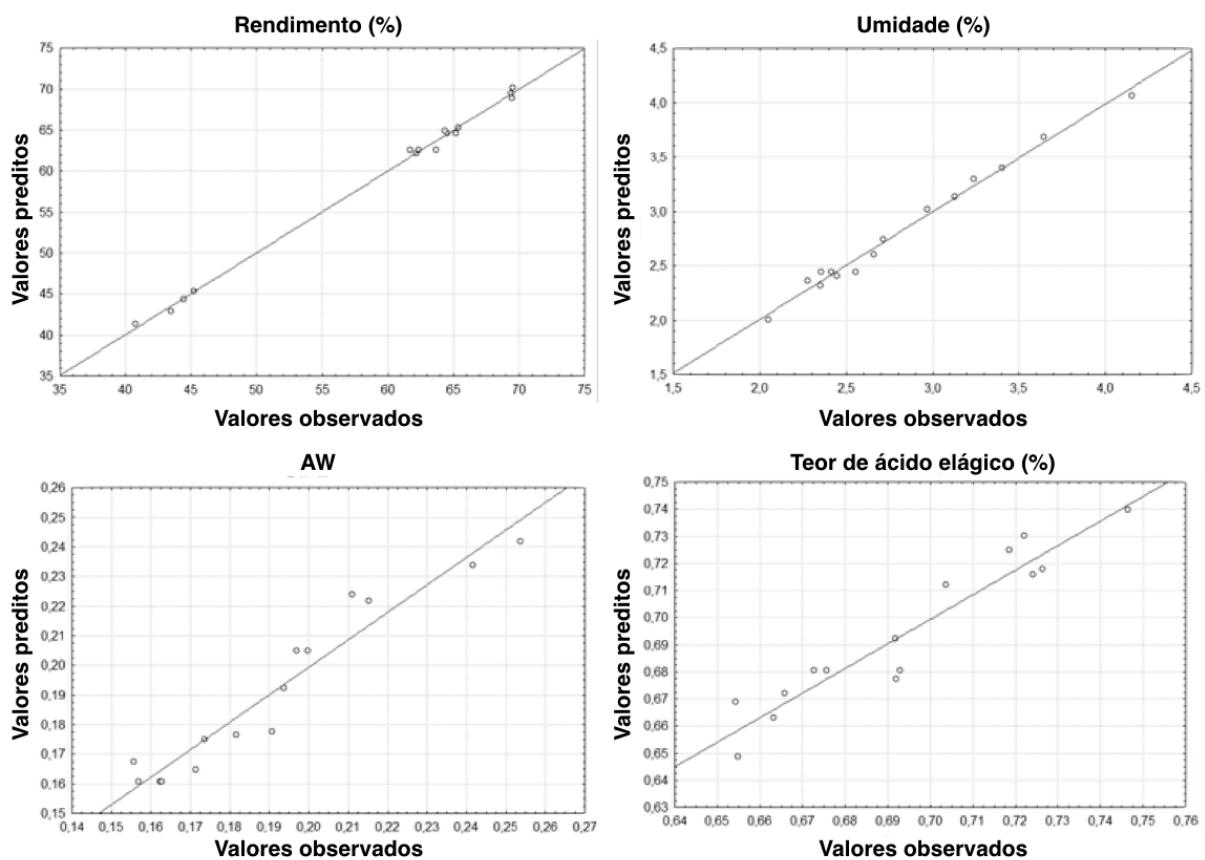


Legenda: (A) concentração do adjuvante (% p/p) e vazão do extrato (mL/min.). (B) temperatura de entrada (°C) e vazão do extrato (mL/min.). (C) concentração do adjuvante (% p/p) e temperatura de entrada (°C). Nota: concentração de adjuvante em % (p/p) em relação a massa de sólidos totais do extrato líquido.

Na Figura 31 B é possível observar dois comportamentos distintos em função do teor de ácido elágico: Quando as menores vazões e temperaturas mais altas são relacionadas a maiores teores de ácido elágico e quando ocorre o oposto, vazões mais altas e temperaturas mais baixas são relacionadas a maiores teores de ácido elágico. Borges et al (2015) encontrou um comportamento semelhante para interação destas mesmas variáveis independentes em função do conteúdo de fenólicos totais em extratos secos obtidos a partir de resíduos de jabuticaba. Na primeira situação é possível que ocorra uma maior liberação de ácido elágico dentre outros compostos fenólicos a partir de uma hidrólise dos elagitaninos, acentuada pela temperatura (BORGES et al, 2015).

As repostas observadas para o segundo delineamento experimental se aproximaram mais dos valores preditos pelo modelo em com comparação com o delineamento anterior (Figura 32).

**Figura 32:** Correlação entre os valores preditos e observados para as respostas avaliadas na secagem dos extratos do segundo delineamento experimental.



Com base nos gráficos de superfície de resposta e utilizando a função geral de otimização foram propostos os parâmetros apresentados na Tabela 26 para a obtenção de um valor de deseabilidade de 0,8630 levando em consideração as quatro respostas (variáveis dependentes) estudadas. Este valor de deseabilidade se mostrou superior ao de outros estudos de otimização do processo de secagem de extratos por aspersão *Spray Drying* (BORGES et al 2015; CORTÉS-ROJAS, SOUZA & OLIVEIRA, 2015). Este fato demonstra a capacidade do modelo em maximizar as respostas de rendimento e teor de ácido elágico e de minimizar as respostas de umidade e atividade de água.

**Tabela 26:** Valores preditos para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia uniflora* L. por aspersão (*Spray Drying*).

| Variáveis independentes otimizadas | Valores | Rendimento (%) | Umidade (%) | AW     | Teor de ácido elágico (%) |
|------------------------------------|---------|----------------|-------------|--------|---------------------------|
| Temperatura de entrada (°C)        | 144     |                |             |        |                           |
| Vazão do extrato (mL/min)          | 9       | 71,04          | 2,49        | 0,1605 | 0,7226                    |
| Concentração do adjuvante (%p/p)   | 49      |                |             |        |                           |

#### 4.7.3.2. Reprodução e caracterização dos extratos obtidos com as condições de secagem otimizadas

A fim de se verificar a reprodutibilidade dos parâmetros otimizados no modelo Box Behnken ( $3^3$ ) foi realizada uma nova bateria de três secagens utilizando temperatura de entrada de 144°C, vazão do extrato de 9,0 mL/minuto e concentração do adjuvante em 49 % (p/p). O processo foi avaliado pelo rendimento da secagem e os extratos caracterizados pelos testes de umidade, atividade de água e teor de ácido elágico. Os dados da triplicata são apresentados na Tabela 27.

**Tabela 27:** Valores reais para rendimento e dados de caracterização do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia uniflora* L. por aspersão (*Spray Drying*).

| Secagens | Rendimento (%)    | Umidade (%)       | AW                | Teor de ácido elágico (%) |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| 1        | 88,94             | 2,8800            | 0,1827            | 0,7210                    |
| 2        | 85,36             | 2,7533            | 0,1857            | 0,7197                    |
| 3        | 86,63             | 2,5733            | 0,1783            | 0,7166                    |
| Média    | $86,98 \pm 1,81$  | $2,7356 \pm 0,15$ | $0,1822 \pm 0,00$ | $0,7190 \pm 0,00$         |
| DPR      | 2,0868            | 5,6334            | 2,0233            | 0,3157                    |
| %*       | $122,43 \pm 2,55$ | $109,86 \pm 6,18$ | $113,53 \pm 2,29$ | $99,51 \pm 0,31$          |

Legenda: DPR: desvio padrão relativo. \* porcentagem em relação ao valor predito pelo modelo. Condições de secagem: diâmetro do bico de aspersão de 1,2 mm, fluxo do ar comprimido de 40 L/min., pressão do ar comprimido de 4,0 Kg/F, fluxo do ar de secagem de 3,0 m<sup>3</sup>/min; temperatura de entrada de 144°C, vazão do extrato de 9,0 mL/min. concentração do adjuvante de 49% (p/p).

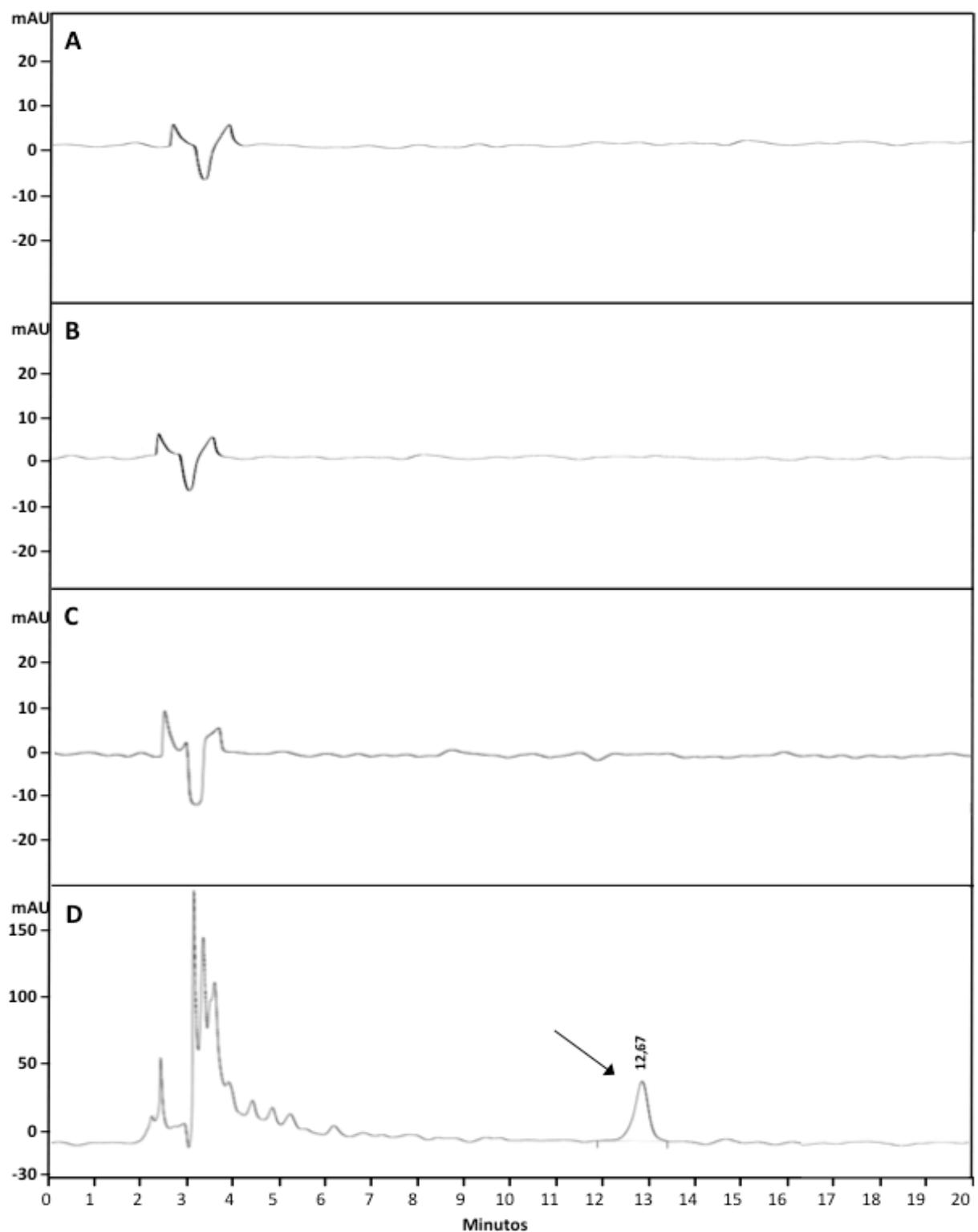
O experimento mostrou valores com boa concordância aos resultados preditos. Isto denota a adequabilidade do modelo escolhido em demonstrar a influencia dos parâmetros selecionados na otimização sobre as variáveis respostas para a secagem dos extratos obtidos das folhas de *E. uniflora*.

#### 4.7.4. Co-validação da metodologia para quantificação de ácido elágico por CLAE

A co-validação da metodologia por CLAE para avaliação de ácido elágico no extrato seco foi realizada por meio dos testes de especificidade e precisão intermediária/repetibilidade. Os cromatogramas obtidos no teste de seletividade são apresentados na Figura 33.

A especificidade foi comprovada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente (metanol), da fase móvel (85:15 água/acetonitrila 0,05% ácido tricloroacético), do adjuvante de secagem (aerosil) e da solução amostra do extrato líquido (figura 49). Os cromatogramas não demonstraram co-eluição com o pico de ácido elágico obtido do extrato seco no comprimento de onda da metodologia (254 nm).

**Figura 33:** Cromatogramas do diluente (A), fase móvel (B), aerosil (C) e solução amostra do extrato seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. (D).



Legenda: seta indica o pico de ácido elágico.

Na avaliação da proximidade dos resultados (precisão) representada pelo desvio padrão relativo (DPR), a metodologia apresentou-se adequada (Tabela 28). Os desvios encontrados inferiores aos preconizados pelo Guia de Orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico (DPR<15) (BRASIL, 2014). O DPR entre os dados obtidos dos testes de repetibilidade e precisão intermediária foi de 7,47%.

**Tabela 28:** Dados do teste de precisão para co-validação da metodologia analítica.

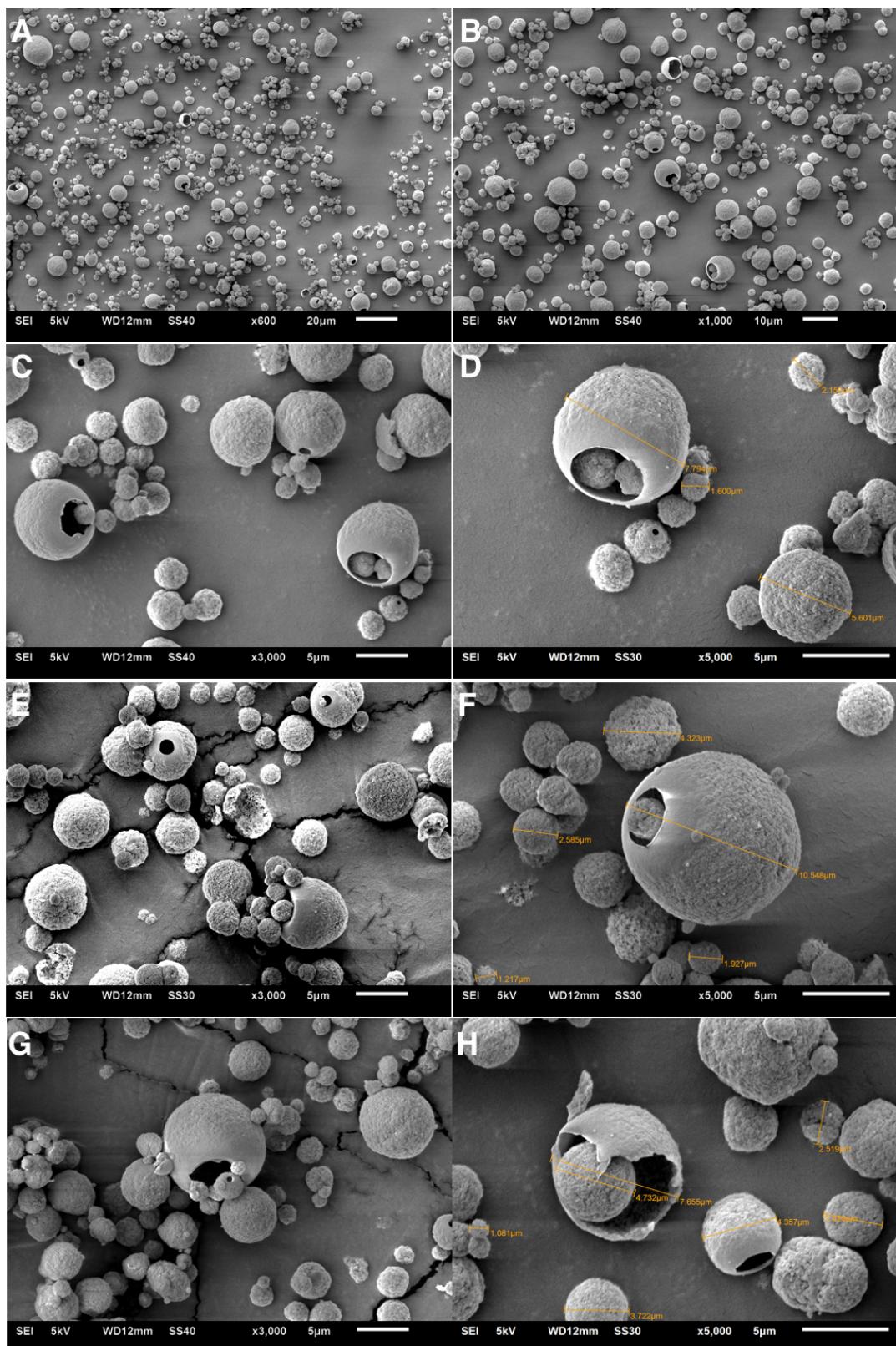
| <b>Amostra</b> | <b>Repetibilidade</b> |          | <b>Precisão Intermediária</b> |          |
|----------------|-----------------------|----------|-------------------------------|----------|
|                | <b>Área</b>           | <b>%</b> | <b>Área</b>                   | <b>%</b> |
| 1              | 610                   | 0,7302   | 615                           | 0,7360   |
| 2              | 581                   | 0,6968   | 588                           | 0,7049   |
| 3              | 507                   | 0,6116   | 507                           | 0,6116   |
| 4              | 516                   | 0,6220   | 509                           | 0,6139   |
| 5              | 509                   | 0,6139   | 528                           | 0,6358   |
| 6              | 587                   | 0,7037   | 552                           | 0,6634   |
| Média          | 551,67                | 0,6630   | 549,83                        | 0,6609   |
| Desv.pad       | 46,04                 | 0,0530   | 44,02                         | 0,0507   |
| DPR            | 8,35                  | 8,00     | 8,01                          | 7,67     |

Legenda: Desv.pad.: desvio padrão, DPR: desvio padrão relativo.

#### 4.7.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato seco das folhas de *E. uniflora*.

A avaliação morfológica das partículas do extrato seco, obtido nas condições otimizadas, revelou partículas irregulares de formato esférico, conforme esperado para extratos vegetais (CALISKAN & DIRIN, 2013; GALLO et al, 2011; SAÉNZ el al, 2009). A superfície apresentou-se rugosa e os diâmetros das partículas observadas variaram entre 1,08 e 10,548 µm (Figura 34). É possível observar partículas maiores contendo outras de menor tamanho (Figura 34 D), em alguns casos, ocorre o rompimento destas partículas maiores liberando as demais (Figura 34 H). Segundo Oliveira e Petrovick (2009) com a evaporação superficial da gotícula aspergida há a formação de uma camada de material seco externa. Por meio desta camada ocorre a saída do líquido do interior da gotícula. Dependendo da elasticidade e permeabilidade da crosta, podem ser produzidos diversos materiais como esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas.

**Figura 34:** Extrato seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A-D fotomicrografias da primeira replicata do extrato seco. E e F fotomicrografias da segunda replicata do extrato seco. G e H fotomicrografias da terceira replicata do extrato seco.



A concentração de Aerosil® já foi apontada como um fator determinante na morfologia das partículas secas de extratos vegetais. Cortés-Rojas, Souza e Oliveira (2015) relataram partículas de menor tamanho associadas a maiores concentrações de Aerosil®. Um comportamento diferente foi apontado por Souza (2014) utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem. Neste estudo a maior proporção de maltodextrina levou a formação de partículas com diâmetros maiores, que foi associado a maior viscosidade do extrato levando a formação de gotículas maiores durante a aspersão. A formação de partículas menores com o Aerosil® pode ser explicada com base em suas propriedades físicas como tamanho reduzido, baixa densidade e elevada superfície de contato (CORTÉS-ROJAS, SOUZA E OLIVEIRA, 2015).

## 5. CONCLUSÕES

Os dados de caracterização do material vegetal encontrados neste trabalho mostram-se em conformidade com a monografia da espécie *E. uniflora* na Farmacopeia Brasileira 5º edição. A análise morfoanatômica além de confirmar muitas das características comuns à família Myrtaceae, também apontou estruturas que, quando associadas, apresentam valor de diagnose.

A metodologia desenvolvida por CLAE se mostrou adequada para a quantificação de ácido elágico presente nos extratos das folhas de *E. uniflora*, e desta forma foi validada para avaliação do marcador no extrato líquido e co-validada para o extrato seco.

O desenho experimental selecionado para o aprimoramento dos sistemas de EAU e secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*) foi capaz de demonstrar o impacto das variáveis independentes frente às variáveis respostas e prever comportamentos.

Na obtenção do extrato líquido por EAU foi encontrado um valor de  $93,7\% \pm 0,4$  da concentração de ácido elágico em relação ao valor predito para as condições otimizadas (grau alcoólico de 44% p/p, tempo de extração de 22 minutos e temperatura de extração de 59°C).

Na secagem dos extratos por aspersão (*Spray Drying*) a análise dos gráficos de superfície de resposta em concordância com a função geral de otimização indicou que temperatura de entrada de 144°C, vazão do extrato de 9mL/min e concentração de Aerosil® de 49% (p/p) em relação ao conteúdo de sólidos totais do extrato líquido seriam as melhores condições para otimização do rendimento de secagem (%), umidade (%), atividade de água e teor de ácido elágico(%) dos extratos secos.

Os resultados apresentados servem como base para aquisição de parâmetros de qualidade na obtenção de extratos a partir das folhas de *E. uniflora* e na obtenção de matéria-prima para a produção de fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential components by gas chromatography/mass spectrometry.** 4º ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165-171, 1991.

ALVES, E.S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E.L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambiente rural e urbano, Sp, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 241-248, 2008.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 307-314, 1999.

ARULMOZHI, V.; PANDIAN, K.; MIRUNALINI, S. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, n. 1, p. 313-320, 2013.

AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2007.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; DÁVILA-ACEDO M. A. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1704-1712, 2011.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodogogy (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BOEGER, M.R.T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Optimization of the Spray-Drying process for developing Jabuticaba waste powder employing response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**. Junho de 2014. Brasília, DF: ANVISA 2014

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014**. Brasília, DF: ANVISA, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial União**, Brasília: Anvisa, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Brasília, 2003.

CALISKAN, G. & DIRIM, N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextran addition during spray drying of sumac extract. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 539-548, 2013.

CALIXTO, J. B. & SIQUEIRA, J. M. J. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CALIXTO, J. B. Biopirataria: a diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**, v. 28, n. 2, p. 37-43, 2000.

CARVALHO JUNIOR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. Constituentes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabensis* Klaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic contente, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442-2451, 2011.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 80, p, 1118-1125, 2000.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 33-39, 1999.

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 2001.

COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHINC, J. C.; FERRI, P. H. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.851-858, 2010.

COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal Variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1287-1293, 2009.

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, A. P. Development of a Phytopharmaceutical Intermediate Product via Spray Drying. **Drying Technology**, v. 29, p. 709-718, 2011.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Physico-chemical characterization of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) leaves powder. **Revista Eletronica de Farmácia** v. 4, p. 59-69, 2009.

COUTO, R. O.; MARTINS, F. S.; CHAUL, L. T.; CONCEIÇÃO, E. C.; FREITAS, L. A. P.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 115-123, 2013.

DIAS, C.L.; RODRIGUES, K.A.F.; RESPLANDES, S.M.; AGUIAR, L.R.; AMARAL, F.M.M.; MORAES, D.F.C. Caracterização Farmacobotânica das Folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em São Luiz – MA, Brasil. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 14, n. 2, p. 95-102, 2012.

DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 n. 3, p. 426-223, 2007.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

ESPÍN, J. C.; LARROSA, M.; GARCÍA-CONEZA, M. T.; & TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: The evidence so far. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p 1-15, 2013.

FERREIRA, C. L. S.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.

FESTA, F.; ALGIMMI, T.; DURANTIN, G.; RICORDY, R.; PERTICONE, P.; COZZI, R. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalina cells in vitro revealed by the comet assay. **Anticancer Research**, v. 21, n. 6A, p. 3903-3908, 2001.

FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL L.M.F., Paula, J.R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2008.

GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, p. 205-214, 2011.

GAN, C. & LATIFF, A. A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1277-1283, 2011.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. Spray drying og the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidante activity. **Food Science and Tehcnology**, v. 41, p. 1521-1527, 2008.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M. E.; CAUDURO, A. D.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Aromatic Plants from Brazil. II. The Chemical Composition of some *Eugenia* Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, n. 5, p. 501-505, 1993.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brasilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2009.

HOSSAIN, M.B.; BRUNTON, N.P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONELL C.P. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 582–590, 2012.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M. P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F. **Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products**. Colombia: SECAB e CYTED, 2008.

HUSSEIN, M. Z.; ALI, S. H. A.; ZAINAL, Z.; HAKIM, M. N. Development of antiproliferative nanohybrid compound with controlled release property using ellagic acid as the active agent. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1373-1383, 2011.

**ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology—ICH Harmonized Tripartite Guideline**, Geneve, 2005.

ILBAY, Z.; SAHIN, S.; KIRBASLAR, I. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of resehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2804-2809, 2013.

JORGE, L.I.F.; OLIVEIRA, F.; KATO, E.T.M.; OLIVEIRA, I. Caracterização farmacognóstica das folhas e dos frutos de *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae. **Lecta**, v. 2, p. 103-120, 1994.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

KIM, J. H.; SEO, C.; KIM, S.; HA, H. Simultaneous determination of gallic acid, ellagic acid, and eugenol in *Syzygium aromaticum* and verification of chemical antagonistic effect by the

combination with Curcuma aromatic using regression analysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

KISS, A.K.; BAZYLKO, A.; FILIPEK, A.; GRANICA, S.; JASZEWSKA, E.; KIARSZYS, U.; KÓSMIDER, A; PIWOWARSKI, J. Oenothein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of Epilobium sp. **Phytomedicine**, v. 18, p. 557-560, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.

KUROZAWA, L. E.; MORASSI, A. G.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. **Spray Drying of protein hydrolysate of chicken breast meat**. Em 4<sup>th</sup> InterAmerican drying conference Montreal, Canada, 2009. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/266870692\\_SPRAY\\_DRYING\\_OF\\_PROTEIN\\_HYDROLYSATE\\_OF\\_CHICKEN\\_BREAST\\_MEAT](http://www.researchgate.net/publication/266870692_SPRAY_DRYING_OF_PROTEIN_HYDROLYSATE_OF_CHICKEN_BREAST_MEAT)>. Acesso em: 23 de out. 2015.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G.; SANTOS, R. T.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LANDETTE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, funtions and helth. **Food and Research International**, v. 44, p. 1150-1160, 2011.

LEE, M.; CHIOU, J.; YEN, K.; YANG, L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, p. 131-136, 2000.

LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L. YEN, K.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LEWINSOHN, T. M. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. Avaliação do Estado do Conhecimento da Biodiversidade Brasileira. **Biodiversidade**, v. 1, p. 21-109, 2006.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295-300, 2005.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1989.

LIU, Y.; WANG, W.; FANG, G.; MA, F.; ZHENG, Q.; DENG, P.; ZHAO, S.; CHEN, M.; YANG, G.; HE, G. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 95-102, 2013.

LORCA, G.G.; AMAT, A.G.; GONZÁLES, C. Análisis comparativo de caracteres diagnósticos para la identificación de tres especies argentinas de Myrtaceae empleadas en la medicina popular. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 14:81-86, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A **Plantas Medicinais no Brasil:** nativas e exóticas. 2 a ed. Nova Odessa, São Paulo, 2008.

LOSSO, J. N.; BANSODE, R. R.; TRAPPEY, A.; BAWADI, H. A.; TRUAX, R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 672-678, 2004.

MAATOOQ, G. T.; STUMPF, D. K.; HOFFMAN, J. J.; HUTTER, L. K.; TIMMERMANN, B. N. Antifungal eudesmanoids from *Parthenium argentatum* x *P. tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 519-524, 1996.

MARQUES, L. G.; FERREIRA, M. C.; FREIRE, J. T. Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 451-457, 2007.

MARQUES, L.C.; VIGO, C.L.S. **Preparação e padronização de extratos vegetais**. In: LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 169-204.

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

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

MASAMUNE, A.; SATOH, M.; KIKUTA, K.; SUZUKI, N.; SATOH, K.; SHIMOSEGAWA, T. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 869-878, 2005.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2009.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 6, p. 727-729, 1999.

MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Identification of Impact Aroma Compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) Leaf Essential Oil. **Journal of Brasilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 179-183, 2007.

MORAIS, S. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. M.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 449-451, 1996.

OGUNWANDE, I.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SCHMIDT, W.N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147–152, 2005.

OLIVEIRA, F. & AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 2º Edição São Paulo: Atheneu, 2014.

OLIVEIRA, L. A.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSÉ, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food and Chemistry**, v. 145, p. 522-529, 2014.

OLIVEIRA, O. W. & PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OUYANG, Z.; ZHANG, L.; ZHAO, M.; WANG, P.; WEI, Y.; FANG, J. Identification and quantification of sesquiterpenes and polyacetylenes in *Atractylodes lancea* from various geographical origins using GC-MS analysis. **Revista Braileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 957-963, 2012.

PENG, F. C. A. O. Study on the Extraction Technology of Tannin from Mountain Walnut Shells. **Agricultural Biootechnology**, v. 3, n. 5, p. 21-23, 2014.

PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich Brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 195-199, 2008.

QUEL, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

RATTMANN, Y. D.; SOUZA, L. M.; PAIVA, S. M. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

ROCHA, L.D.; PREUSSLER, K. H.; PEGORINI, F.; FARIA, V.; MARANHO, L. T. Estudo anatômico comparativo da casca do caule do araçá-amarelo e araçá-vermelho, *Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1114-1122, 2008.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI, T. M.; PEREZ, E. Pharmacognostic evaluation of *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Surinam Cherry), originating from the municipality of Guarapuava, PR. **Biosaúde**, v. 12, n. 1/2, p. 1 – 13, 2010.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 616-622, 2009.

SAHIN, S.; AYBASTIER, ONDER.; ISIK, ESRA. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1361-1368, 2013.

SAMY, M. N.; SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; KAMEL, M. S. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 7 p. 37-47, 2014.

SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R. N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora*, L. na composição química do óleo essencial. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 762-768, 2015.

SANTOS, S. C.; CARVALHO, A. G.; FORTES, G. A. C.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, A. E. Variable-Temperature NMR and conformational Analysis of Oenothein B. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 282-289, 2014.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 44, p.137-142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, S.; ARIAS, R. Preliminary Phamacological Studies on *Eugenia uniflora* Leaves: Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183-186, 1987.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 360-367, 2005.

SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, n. 1-2, p. 63-68, 2004.

SIGMA-ALDRICH. **Catalog Search for ellagic acid and oenothein B**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=oenothein&interface>All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt&region=BR&focus=product>>. Acesso em: 13 de out. 2015.

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

SOUZA, J. N. Obtenção de extratos padronizados a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e avaliações biológicas in vitro: Obtenção de extratos

secos por atomização do extrato líquido padronizado de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

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.

SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 94-98, 2006

THORNHILL, A. H.; POPPLE, L. W.; CARTER, R. J.; HO, S. Y. W.; CRISP, M. D. Are pollen fossil useful for calibrating relaxed molecular clock dating of phylogenies? A comparative study using Myrtaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 1, p. 15-27, 2012.

TOMÁZ-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6535–6538, 2014.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto contexto enfermagem**, v. 14, n. 15, p. 112-121, 2006.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-κB, iNOS, COX-2, TNF-α, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. **Carcinogenesis Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 650-655, 2010.

VAN DEN DOOL, H. & KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system includin linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; MOURA, R. T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VIEIRA, S. C. H.; PAULO, L. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, A.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

VITALONE, A.; MACCOLL, J.; THOME, D.; COSTA, L. G.; TITA, B. Characterization of the effect of Epilobium extracts on human cell proliferation. **Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 79-87, 2003.

WANG, X.; WU, Y.; CHEN, G.; YUE, W.; LIANG, Q.; WU C., Qinan. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrassonics Sonochemistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.

WHO. World Health Organization. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva, 2002.

WHO. World Health Organization. **Primary Health Care, report of the International Conference on Primary Helth Care**. Geneva, 1978.

WHO. World Health Organization. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. Spain, 2007.

WYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTIMEIN, B. O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* L. leaf oil. **Planta Med**, v. 6, p. 546-549, 1988.

WU, Q.; SHI, Y.; JIA, Z. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. **Natural Product Report**, v. 23, n. 5, p. 699-734, 2006.

YOLMEH, M.; NAJAFI, M. B. H.; REZA F. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319-324, 2014.

YOSHIDA, T.; CHOU, T.; MATSUDA, M.; YASUHARA, T.; YAZAKI, K.; HATANO, T.; NITTA, A.; OKUDA, T. Woodfordin D and oenothein A, trimeric hydrolyzable tannins of macro-ring structure with antitumor activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 5, p. 1157-1162, 1991.

ZAFRILLA, P.; FERRERES, F. & TOMAS-BARBERAN. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3651-3655.

ZANG, L.; WANG, Y.; XU. M. Acid hydrolysis of crude tannins from infructescence of *Platycarya strobilacea* Sieb. Et Zucc to produce ellagic acid. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 28, n. 19, p. 1637-1640, 2014.

ZANG, L.; XU. M.; WANG, Y.; WU, D.; CHEN, J. Optimizing Ultrasonic Ellagic Acid Extraction Conditions from Infructescence of *Platycarya strobilacea* Using Response Surface Methodology. **Molecules**, v. 15, p. 7923-7932, 2010.

ZHONG, Z.; CHEN, X.; TAN, W.; XU, Z.; ZHOU, X.; WU, T.; CUI, L.; WANG, Y. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. **European Journal od Pharmacology**, v. 667, p. 50-55, 2011.