

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *stricto sensu* EM
CIÊNCIAS MOLECULARES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA DO EXTRATO E
MICROPARTÍCULAS OBTIDAS DE
Erythroxylum suberosum (Erythroxylaceae) St.
- Hil.**

ALESSANDRO BASTOS RODRIGUES

ANÁPOLIS – GO
2017

ALESSANDRO BASTOS RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA DO EXTRATO E
MICROPARTÍCULAS OBTIDAS DE
Erythroxylum suberosum (Erythroxylaceae) St.
- Hil.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Dr^a. Giuliana Muniz Vila Verde

Anápolis – GO
2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BB327d Bastos Rodrigues, Alessandro
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica do extrato e micropartículas obtidas de *Erythroxyllum suberosum* (Erythroxyllaceae) St. - Hil. / Alessandro Bastos Rodrigues; orientador Giuliana Muniz Vila Verde; co-orientador Aline Mendonça Pascoal. -- Anápolis, 2017.
73 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

1. *Erythroxyllum suberosum*. 2. Erythroxyllaceae. 3. Micropartículas.
4. Validação. I. Muniz Vila Verde, Giuliana, orient. II. Mendonça Pascoal, Aline, co-orient. III. Título.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DO
EXTRATO E MICROPARTÍCULAS OBTIDOS DE *Erythroxylum suberosum* ST. –
HIL. (ERYTHROXYLACEAE)

ALESSANDRO BASTOS RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do
Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da
Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários
para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 30/05/2017 por:

Profa. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde (Orientadora/UEG)

Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino (UEG)

Profa. Dra. Érika Crispim Resende (IFGoiano)

ANÁPOLIS – GO

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha querida esposa Núbia Honorato Pereira, amiga constante e incentivadora. Aos queridos, meus sempre pequenos Bibicius e Deba.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado;

À Universidade Estadual de Goiás (UEG) e seus professores pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional;

À professora Dr^a. Giuliana Muniz Vila Verde pela oportunidade, paciência e orientação durante a realização deste trabalho;

À Indústria Farmacêutica Brasileira, seus profissionais e amigos, onde o conhecimento técnico e incentivo me levou a esta oportunidade;

Aos meus amigos da indústria e que levo para a vida, pelo constante aprendizado: Eduardo, Carlos Borges, Agnaldo, Jefferson Luiz, Rone Aureliano, Adir, Igor, Alexandre e tantos outros;

À Mayara e Drauton pelo grande auxílio nesse projeto;

Aos meus pais que sempre acreditaram e me incentivaram na busca e realização dos meus objetivos;

Ao Valdeir pelas orientações e paciência na condução dos testes no *Spray Dryer*;

Em especial ao Renato Gomes Santos, por sua ajuda constante e paciência, um exemplo de dedicação a ser seguido;

À FAPEG pelo apoio financeiro.

O homem não consegue viver sem uma confiança duradoura em algo indestrutível nele mesmo, muito embora tanto o indestrutível como a confiança possam permanecer-lhe ocultos de maneira contínua. Uma das possibilidades dessa ocultação permanente é a crença em um Deus pessoal. (Franz Kafka)

RESUMO

O gênero *Erythroxylum*, com cerca de 230 espécies é o único representado na região Neotropical. Espécies pertencentes a esse gênero possuem propriedades anti-inflamatória e antibacteriana, estimulantes do sistema nervoso central e hepatoprotetora como *E. coca* e *E. catuaba* respectivamente. Assim, o objeto dessa pesquisa é a espécie *Erythroxylum suberosum* A. St. -Hil. que é uma planta nativa utilizada na medicina popular como por suas propriedades anti-inflamatórias. Estudos anteriores identificaram a presença de flavonoides, terpenos e alcaloides nessa espécie despertando o interesse para a validação de metodologia analítica que visem a quantificar o marcador e contribuir para a utilização do extrato de *E. suberosum* como derivado vegetal como possível matéria-prima vegetal. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo validar metodologia analítica de quantificação do marcador rutina no extrato bruto e extrato seco de *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil. (*Erythroxylaceae*), bem como desenvolver um derivado vegetal microencapsulado por *spray drying*. Na caracterização farmacognóstica da droga vegetal, o pó das folhas apresentou teor de umidade 7,04%, teor de cinzas 10,49%, e material estranho de 0,8%. Na validação da quantificação da rutina por CLAE-DAD no extrato foram avaliados parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando a eficiência da metodologia utilizada. Na obtenção do extrato seco houve rendimento de 11,91%. Na obtenção do derivado encapsulado *spray drying* para formação de micropartículas foi testada utilizando adjuvantes de secagem maltodextrina nas concentrações de 0,32%; 0,64%; 1,60%; 3,2% e 4,8%, resultou em decréscimo no teor de rutina à medida em que se aumentava a massa de maltodextrina. Testes de fotoestabilidade dos extratos foram realizados e verificou-se que a rutina, bem como os extratos vegetais são estáveis à incidência de luz. Na caracterização das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura foi observada a formação de partículas esféricas de superfície lisa e rugosa, características da ação do calor fornecido no processo de atomização, bem como inerente à utilização da maltodextrina. Este trabalho congregou importantes informações farmacognósticas e farmacotécnicas para a espécie em questão, bem como para o estudo futuros de outras espécies do Cerrado.

ABSTRACT

The genus *Erythroxylum*, with about 230 species is the only one represented in the Neotropical region. Species belonging to this genus have anti-inflammatory and antibacterial properties, central nervous system and hepatoprotective stimulants such as *E. coca* and *E. catuaba*, respectively. Thus, the object of this research is the species *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil. Which is a native plant used in folk medicine as for its anti-inflammatory properties. Previous studies have identified the presence of flavonoids, terpenes and alkaloids in this species, arousing the interest for the validation of analytical methodology to quantify the marker and to contribute to the use of *E. suberosum* extract as a vegetable derivative as a possible vegetable raw material. In this context, the present work had as objective to validate analytical methodology of quantification of rutin marker in the crude extract and dry extract of *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil. (*Erythroxylaceae*), as well as to develop a microencapsulated vegetable derivative by spray drying. In the pharmacognostic characterization of the plant drug, leaf powder had a moisture content of 7.04%, ash content 10.49%, and a 0.8% foreign material. In the validation of routine quantification by CLAE-DAD in the extract parameters of specificity, selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness were evaluated, demonstrating the efficiency of the methodology used. The yield of the dry extract was 11.91%. In obtaining the encapsulated spray drying derivative for microparticle formation was tested using maltodextrin drying adjuvants at concentrations of 0.32%; 0.64%; 1.60%; 3.2% and 4.8% resulted in a decrease in rutin content as the mass of maltodextrin was increased. Photoestability tests of the extracts were performed and it was found that the rutin as well as the plant extracts are stable at the incidence of light. In the characterization of the microparticles by scanning electron microscopy the formation of spherical particles of smooth and rough surface was observed, characteristic of the heat action provided in the atomization process, as well as inherent to the use of maltodextrin. This work gathered important pharmacognostic and pharmacotechnical information for the species in question, as well as for the future study of other Cerrado species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Spray Dryer</i>	16
Figura 2 - <i>Erythroxylum suberosum</i>	19
Figura 3 - Substâncias isoladas de <i>E. suberosum</i>	20
Figura 4 - Estruturas genéricas dos principais flavonoides	22
Figura 5 - Estruturas de outros flavonoides menos importantes.....	22
Figura 6 - Estrutura química da rutina	24
Figura 7 - Fotomicrografias do pó das folhas de <i>E. suberosum</i>	40
Figura 8 - Perfil cromatográfico (CCD) do pó das folhas de <i>E. suberosum</i> FM: metanol P.A.....	42
Figura 9 - Cromatograma solução amostra do pó das folhas de <i>E. suberosum</i>	43
Figura 10 - Cromatograma solução padrão de rutina 0,2mg/mL ..	43
Figura 11 - Produção do extrato seco de <i>E. suberosum</i>	44
Figura 12 - Cromatograma solução amostra do extrato bruto de <i>E. suberosum</i>	48
Figura 13 - Cromatograma solução padrão de rutina 0,2mg/mL ..	48
Figura 14 - Cromatograma do diluente metanol	48
Figura 15 - Espectro de absorção de rutina na solução padrão 0,2mg/mL	49
Figura 16 - Espectro de absorção de rutina na solução amostra do extrato bruto ...	49
Figura 17 - Espectro de absorção do Pico 1 na solução amostra do extrato bruto ..	49
Figura 18 - Espectro de absorção do Pico 2 na solução amostra do extrato bruto ..	49
Figura 19 - Cromatograma solução amostra do extrato seco de <i>E. suberosum</i>	51
Figura 20 - Cromatograma solução padrão de rutina 0,4mg/mL	51
Figura 21 - Cromatograma do diluente metanol	51
Figura 22 - Cromatograma do adjuvante maltodextrina	51
Figura 23 - Espectro de absorção de rutina na solução padrão 0,4mg/mL	52
Figura 24 - Espectro de absorção de rutina na solução amostra do extrato seco	52
Figura 25 - Espectro de absorção do Pico 1 na solução amostra do extrato seco ...	52
Figura 26 - Espectro de absorção do Pico 2 na solução amostra do extrato seco ...	52
Figura 27 – Curva de calibração do padrão de rutina – 1º dia	54
Figura 28 – Curva de calibração do padrão de rutina – 2º dia	55
Figura 29 – Curva de calibração do padrão de rutina – 3º dia	56
Figura 30 – Imagem das partículas de <i>E. suberosum</i> em extrato seco (atomizado). 65	
Figura 30 – Imagem das partículas de <i>E. suberosum</i> (4,8% de maltodextrina).	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Parâmetros de Operação <i>Spray Dryer</i>	30
Quadro 2 - Parâmetros de adequabilidade do sistema	30
Quadro 3 - Gradiente de Fase Móvel	32
Quadro 4 - Parâmetros de robustez	38
Tabela 1 - Resultados do teste de granulometria	41
Tabela 2 - Resultados de teor de rutina no pó das folhas de <i>E. suberosum</i>	43
Tabela 3 - Resultados de teor de rutina no extrato seco de <i>E. suberosum</i>	45
Tabela 4 - Resultados de adequação do sistema extrato bruto de <i>E. suberosum</i> ...	45
Tabela 5 - Resultados de adequação do sistema extrato seco de <i>E. suberosum</i> ...	46
Tabela 6 - Resultado da pureza de pico na solução padrão de rutina 0,2mg/mL ...	47
Tabela 7 - Resultados da seletividade do extrato bruto de <i>E. suberosum</i>	47
Tabela 8 - Resultado de teor da seletividade do extrato bruto de <i>E. suberosum</i>	47
Tabela 9 - Resultado da pureza de pico na solução padrão de rutina 0,4mg/mL ...	50
Tabela 10 - Resultado da seletividade do extrato seco de <i>E. suberosum</i>	50
Tabela 11 - Resultado de teor da seletividade do extrato seco de <i>E. suberosum</i> ...	50
Tabela 12 - Linearidade 1ºDia	53
Tabela 13 - Linearidade 2ºDia	54
Tabela 14 - Linearidade 3ºDia	55
Tabela 15 - Relação sinal ruído do ativo rutina.....	56
Tabela 16 - Limite de quantificação determinado	57
Tabela 17 - Precisão 1º Dia – extrato bruto	58
Tabela 18 - Precisão Intermediária – extrato bruto	58
Tabela 19 - Precisão 1º Dia – extrato seco.....	59
Tabela 20 - Precisão Intermediária – extrato seco.....	59
Tabela 21 - Exatidão – extrato bruto	61
Tabela 22 - Exatidão – extrato seco	62
Tabela 23 - Robustez – extrato bruto.....	63
Tabela 24 - Robustez – extrato seco	63

Tabela 25 - Resultado do teor de rutina no extrato seco de *E. suberosum*64

Tabela 26 - Resultado de fotoestabilidade do extrato seco de *E. suberosum*.....64

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE QUADROS E TABELAS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E <i>SPRAY DRYER</i>	15
3.3 A ESPÉCIE <i>Erythroxyllum suberosum</i>	17
3.5 FLAVONÓIDES.....	21
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 MATERIAL BOTÂNICO	26
5.2 MÉTODOS.....	26
5.2.1 Caracterização do material vegetal	26
5.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	29
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO E PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POR <i>SPRAY DRYING</i>	29
5.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA NO EXTRATO BRUTO E NO EXTRATO SECO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	30
5.5.1 Sistema cromatográfico - Adequação do Sistema (System Suitability).....	31
5.5.2 Determinação das condições de operação do sistema cromatográfico.....	31
5.6 ANÁLISE DO EXTRATO SECO ENCAPSULADO.....	38
Caracterização das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura.....	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	40
6.1.2 Análise Microscópica dos pós.....	40
6.1.3 Pesquisa de material estranho.....	40
6.1.4 Determinação do teor de cinzas.....	41
6.1.5 Análise Granulométrica.....	41

6.1.6	Determinação da perda por dessecação.....	41
6.1.7	Determinação do perfil cromatográfico do pó das folhas de <i>E. suberosum</i> por cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	41
6.1.8	Determinação do teor de rutina no material vegetal por CLAE-DAD.....	42
6.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	44
6.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO	44
6.4	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA NO EXTRATO BRUTO E EXTRATO SECO DE <i>E. suberosum</i> POR CLAE-DAD.....	45
6.4.1	Adequação do sistema (<i>System Suitability</i>).....	45
6.4.2	Seletividade.....	46
6.4.4	Limite de quantificação.....	56
6.4.4	Precisão – extrato bruto de <i>E. suberosum</i>	57
6.4.5	Precisão – extrato seco de <i>E.suberosum</i>	59
6.4.6	Exatidão - extrato bruto de <i>E. suberosum</i>	60
6.4.7	Exatidão - extrato seco de <i>E.suberosum</i>	61
6.4.8	Robustez - extrato bruto de <i>E.suberosum</i>	62
6.4.9	Robustez - extrato seco de <i>E.suberosum</i>	63
6.5	Análise do extrato seco encapsulado.....	63
6.6	Análise de fotoestabilidade do extrato seco encapsulado.....	64
6.7	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	64
7.	CONCLUSÕES.....	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais fornecem substâncias químicas com variadas propriedades farmacológicas, além de se constituírem como modelos para modificações estruturais importantes no desenvolvimento de protótipos de fármacos e ou fitofármacos, propiciando o avanço na pesquisa, que se beneficia com uma grande biodiversidade a ser explorada posicionando o Brasil, como um dos futuros expoentes no setor (KLEIN et al., 2009)

Atualmente a atenção destinada aos fitoterápicos por parte das políticas nacionais, tem se preconizado o fomento à pesquisa e ao desenvolvimento da indústria farmacêutica brasileira diante de um mercado que cresce percentualmente mais do que o de medicamentos sintéticos convencionais (CARVALHO, 2008).

Contudo, para a indústria farmacêutica, uma das grandes dificuldades em se estabelecer protocolos de controle de qualidade para fitoterápicos reside em se determinar, os constituintes químicos, os marcadores, os métodos de detecção e quantificação para cada espécie vegetal em particular, bem como um processo extrativo adequado e reprodutível, que em sua maioria não possui descrição na literatura.

A variabilidade química apresentada por uma espécie vegetal decorre da influência de fatores intrínsecos (genética) e extrínsecos (relacionados ao ambiente). No caso da droga vegetal oriunda de plantas, há influência das condições de manejo como local de plantio, processo de coleta e secagem, e armazenamento, que comprometerá a qualidade dos extratos a serem utilizados na fabricação de fitoterápicos (KLEIN et al., 2009). Assim, a utilização de extratos vegetais padronizados facilita o alcance da qualidade da matéria-prima para a obtenção do fitoterápico, o controle de qualidade e a realização de ensaios biológicos como preconiza a legislação vigente (DAVID et al., 2004).

Diante do exposto, a presente proposta visa validar a metodologia analítica do extrato seco de *E. suberosum* St. -Hil. (*Erythroxylaceae*) e o desenvolvimento de micropartículas obtidas por *spray drying*, no intuito de fornecer um produto intermediário de maior aplicação no processo de produção de fitoterápicos.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Considerando a biodiversidade da flora goiana, encontra-se a família *Erythroxylaceae*, cujo gênero *Erythroxylum*, com cerca de 130 espécies, ocorre somente no Brasil e apresenta vários usos fitoterápicos cientificamente comprovados, tais como anti-inflamatório, antibacteriano, tônico e estimulante, para o fígado, afecções renais e vesiculares (PLOWMAN e HENSOLD, 2004).

Em relação aos fitoterápicos, o desenvolvimento de métodos para quantificação de seus componentes e/ou marcadores, assim como para os extratos secos, têm sido acompanhado do processo de validação, a fim de disponibilizar uma metodologia alternativa para análises descritas em Farmacopeias ou oferecer uma proposta para quantificação de produtos caracterizados pela ausência de metodologias analíticas (COSTA, 2008). A validação, por sua vez, visa garantir por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados pautando-se em métodos adequados à análise (BRASIL, 2003).

Na obtenção do extrato seco, a secagem por aspersão ou *spray drying* é o método mecânico mais utilizado (TURCHIULI et al., 2005; BAKAN, 1986). Por *spray drying*, microcápsulas ou microesferas podem ser formadas com o intuito de encapsular o extrato vegetal, contribuir para a proteção dos princípios ativos vegetais, bem como constituir um produto intermediário de produção com características de facilidade para manipulação, armazenamento (MU e FENG, 2001).

Assim, como pesquisadores da área de Farmácia, essa proposta está em consonância com a legislação vigente, e se faz relevante à medida que é realizada com *Erythroxylum suberosum* St. –Hil., a) uma espécie do Cerrado cujo gênero (*Erythroxylum*) é o maior pertencente à família *Erythroxylaceae*; (b) por seu valor etnofarmacológico; (c) pela presença de fitoquímicos que revelaram a presença de diterpenos e flavonoides glicosilados, com importante potencial terapêutico; (d) pela ocorrência no mesmo gênero de espécies como *Erythroxylon coca*, fonte do alcaloide tropânico cocaína e *E. catuaba* cujas pesquisas culminaram em registro da patente; (e) pela possibilidade de padronização e controle analítico do extrato seco que poderá constituir a matéria-prima para produção de fitoterápicos e subsídios para pesquisas futuras.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E *SPRAY DRYER*

O desenvolvimento de métodos para quantificação dos componentes ou marcadores de fitoterápicos e extratos secos tem sido acompanhado do processo de validação, a fim de disponibilizar uma metodologia reprodutível ou oferecer uma proposta para quantificação de produtos caracterizados pela ausência de monografias específicas (COSTA, 2008). A validação visa garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados por meio de parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados (BRASIL, 2003).

Extratos vegetais secos por aspersão através da técnica por *spray drying* têm sido empregados tanto como produtos intermediários como produtos finais na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (VASCONCELOS et al., 2005). Sabe-se que a forma fluida dos extratos é a mais comumente comercializada. Contudo, somente após a retirada de parte do líquido extrator é que as formulações sólidas, semi-sólidas ou líquidas podem ser preparadas. Vale ressaltar que as condições de secagem devem ser monitoradas e otimizadas uma vez que pode haver perda de constituintes químicos do extrato (SILVA JÚNIOR et al., 2006).

A secagem por *spray drying* (**Figura 1**) é o método mecânico mais utilizado. A *Figura 1 apresenta o equipamento spray dryer*. Baseia-se na nebulização do líquido (solução, emulsão ou suspensão polimérica) contendo a substância ativa através de uma câmara dessecadora. O solvente é rapidamente evaporado através de uma corrente de ar quente transformando as pequenas gotas em partículas sólidas. Após a evaporação do solvente, as micropartículas são recuperadas (TURCHIULI, et al., 2005; BAKAN, 1986).

Por *spray drying*, microcápsulas ou microesferas podem ser formadas, sendo que o primeiro caso ocorre se o fármaco estiver disperso na solução e no segundo se o fármaco estiver dissolvido na solução polimérica. Diversos tipos de polímeros podem ser utilizados nesta técnica e, além disto, pode-se encapsular tanto fármacos

hidrossolúveis como lipossolúveis contribuindo para a proteção dos princípios ativos vegetais (MU e FENG, 2001).

Figura 1 - *Spray dryer* utilizado no laboratório de Engenharia Agrícola, CCET/UEG



Fonte: Próprio autor.

A microencapsulação é um processo em que substâncias sólidas, líquidas e até mesmo gasosas podem ser encapsuladas em partículas de dimensões microscópicas através da formação de uma membrana que reveste o material a ser encapsulado (ANSEL, 1995). Esta técnica apresenta muitas vantagens como: permitir a obtenção de formas sólidas de óleos, mascarar o sabor ou odor de substâncias ativas e protegê-las contra umidade, calor e oxidação (BAKAN, 1986).

A técnica de microencapsulação apresenta aplicações interessantes no campo da alimentação (encapsulação de aromas e vitaminas) e da agricultura (encapsulação de pesticidas e fertilizantes). E em meados da década de 50 surgiu a ideia de microencapsular medicamentos, objetivando-se uma liberação controlada ou prolongada. Com essa intenção e a de prevenir a irritação gástrica, a aspirina é relatada na literatura como um dos primeiros medicamentos a ser microencapsulado

(JATO, 2001). Além da aplicação dos sistemas microencapsulados na área de fármacos, pesquisas sobre novos sistemas para incorporação de ativos em cosméticos tem sido desenvolvidas (MAGDASSI, 1997), bem como a aplicação da microencapsulação de pigmentos como as betalaínas, na manutenção da cor dos alimentos como fator de atratividade para os consumidores (DALLAGNOL, 2013)

3.2 ADJUVANTE DE SECAGEM MALTODEXTRINA

As maltodextrinas são produzidas a partir do amido, por hidrólise ácida ou enzimática (COSTA,2013). Possuem propriedades físicas de grande interesse na indústria alimentícia e farmacêutica como alta solubilidade, baixa higroscopicidade e viscosidade, sendo largamente utilizadas como agente de encapsulamento auxiliando na diminuição de absorção de água, reduzindo assim a degradação por hidrólise e proliferação microbiológica, aumentando a estabilidade do produto final. (OLIVEIRA et al.,2014)

Na área alimentícia são aplicadas nas formulações de produtos como: molhos para saladas, bebidas, produtos lácteos, embutidos, panificação, confeitaria, encapsulamento de aromas (SCHIMIDT et al., 1993).

3.3 A ESPÉCIE *Erythroxylum suberosum*

O gênero *Erythroxylum* pertence à Erythroxylaceae e constitui-se de aproximadamente 230 espécies, é o único representado na região Neotropical, onde aproximadamente 187 espécies são exclusivas, tendo como principal centro de biodiversidade e endemismo a América do Sul, especialmente o Brasil e a Venezuela, onde são utilizadas em práticas etnomedicinais com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, tônica e estimulante, para o fígado, afecções renais e vesiculares, diurético e no tratamento de doenças venéreas, distúrbios musculares, reumatismo, e doenças respiratórias, tais como bronquite, pneumonia, tuberculose e asma (PLOWMAN e HENSOLD, 2004). No Brasil são encontradas 114 espécies das 187 pertencentes ao gênero *Erythroxylum* e registradas para a América tropical. Destas, aproximadamente 74 possuem distribuição restrita (LOIOLA, 2007).

Dentre as espécies mais relevantes que possuem propriedades medicinais e importância do ponto de vista socioeconômico, destacam-se as populares cocas: *E. novogranatense* (Morris) Hieron. var. *truxillense* e *E. coca* (Lamk.), de onde se obtém a cocaína (BACCHI, 1999). Além disso, a partir de outras espécies isolaram-se metabólitos secundários como flavonoides glicosilados, alcaloides, esteroides, lactonas, cumarinas, açúcares redutores e taninos (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2004). Metabólitos estes, certamente responsáveis por grande parte das atividades biológicas do gênero, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, laxante, e potencializador da função erétil, como a *E. catuaba* que resultou em registro de patente para o método de extração, análise e desenvolvimento de formulações à base do extrato seco e outros (QUEIROZ, 2008; EVANS, 1981; ANSELL et al., 1993; NAKAMURA, 2003).

A espécie *Erythroxylum suberosum* A. St. -Hil. é bastante distribuída no Brasil, sendo encontrada em vinte das vinte e sete unidades federativas do Brasil e em outros países como Bolívia, Paraguai, Guiana Francesa e Venezuela (BARBOSA, 2001). Trata-se de arbusto que varia de 1-2,5 metros de altura (**Figura 2**) (ARAÚJO, FIASHI e AMORIM, 2014), sendo conhecido popularmente como galinha-choca, mercúrio-do-campo, sessenta-e-dois, azogue-do-campo e cabelo-de-negro. Por ser típica do Cerrado esta espécie rebrota vigorosamente após as queimadas. Floresce de agosto a dezembro e frutifica de setembro a janeiro (MENDONÇA, CERVI e GUIMARÕES, 1998).

Figura 2 – Aspecto geral dos ramos de *Erythroxylum suberosum* coletado na Reserva Biológica da Trilha do Tatu/UEG. A- Arbusto com 1,5 m de altura. B – Aspecto geral dos ramos



Fonte: Próprio autor

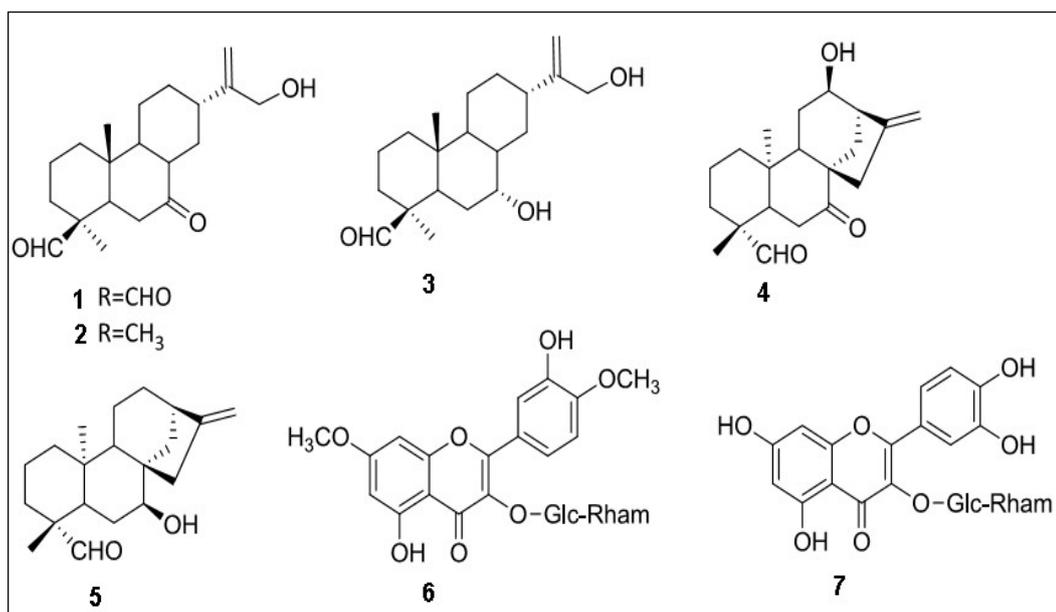
Estudos etnofarmacológicos apontam o uso de *E. suberosum* para curtume e como matéria prima tintorial (MENDONÇA, CERVI e GUIMARÕES, 1998), para tratamento de problemas digestivos, como anestésico e antirreumático (BARBOSA e ZINTO, 2003); contra processos inflamatórios (SOMAVILA, 1998 *apud* VIOLANTE et al., 2012).

Pesquisas anteriores com a espécie *E. suberosum* foram realizadas, como a determinação de parâmetros farmacognósticos de *E. suberosum* por meio da caracterização fitoquímica das folhas dessa espécie, evidenciando-se a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas e resinas; pelo doseamento de fenóis totais, taninos e flavonoides; e teste de pureza, ensaios que apresentaram resultados compatíveis com a literatura para outras espécies de *Erythroxylaceae* (RODRIGUES et al., 2015).

Oliveira et al. (2015) também realizaram estudos fitoquímicos preliminares de extratos de *E. suberosum*, os quais sugeriram a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, antocianinas e taninos condensados no extrato etanólico e de flavonoides, triterpenos e esteroides no extrato acetato-etílico. Dentre os estudos fitoquímicos mais antigos realizados com *E. suberosum* destaca-se o de Silva, Salatino e Panizza (1976) com extratos aquosos e alcoólicos de suas folhas, casca do caule, lenho do caule, casca da raiz e lenho da raiz; os quais evidenciaram apenas a presença de saponinas e taninos em todos os extratos pesquisados.

Nos estudos de NASCIMENTO et al.,(2012) foram isolados compostos cujas estruturas químicas são: três diterpenos abietânicos (**1**, **2 e 3**), dois de esqueleto do tipo entcaurano (**4 e 5**) e dois flavonoides (**6 e 7**), **Figura 3**. Destes compostos **1**, **3**, **4 e 5** são inéditos, sendo o **2** isolado pela primeira vez a partir de um produto natural

Figura 3 - Substâncias isoladas de *E. suberosum*.



Legenda: (1) 7-oxo-16-hidróxi-abiet-15(17)-en-19-al, (2) 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol, (3) 7 α ,16-di-hidróxi-abiet-15(17)-en-19-al, (4) 16-hidróxi-abiet-15(17)-en-7-ona, (5) ent-7 α ,15 β -di-hidróxi-caur-16-en-19-oato de metila, (6) ombuína-3-rutinosídeo e (7) rutina. Fonte: adaptado de GARCEZ et al. (2016) e NASCIMENTO et al. (2012).

Ainda, Nascimento (2014) identificou flavonoides provenientes do extrato etanólico das folhas, sendo eles a quercetina e seus derivados 3-O-monoglicosídeos hiperina e isoquercetina e 3-O-diglicosídeo ombuína-3-rutinosídeo. Do extrato etanólico da raiz foi isolado uma mistura dos flavonóis catequina e epicatequina, além de um éster graxo do β -sitosterol. No caule foram identificados a mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol. Além disso, este estudo também sugeriu a presença dos alcaloides tropanos, tropacocaína e nortropacocaína no extrato etanólico das folhas, estes pela primeira vez na espécie. Nos testes de bioatividade, encontraram bioatividade frente à *Artemia salina* Leach para o extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum* e dos quatro diterpenos isolados (**1**, **2**, **3 e 5**).

Estudos feitos por Violante e colaboradores (2012) também evidenciaram a mesma atividade do extrato etanólico e frações frente à *A. salina*, bem como contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sendo esta espécie, considerada neste trabalho, como bastante promissora para futuros testes biomonitorados.

Além dos testes mencionados, também houve relatos sobre: o potencial antitumoral dos extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas de *E. suberosum* associado à radioterapia (MACEDO et al., 2016); testes de padronização do extrato aquoso das folhas utilizando-se rutina como marcador natural (LEITE et al., 2014); o estudo da atividade antioxidante e sua correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercetina obtidos pelo perfil cromatográfico dos extratos aquoso e etanólico das folhas (MORAIS, 2015); ensaios com extratos de folhas, caule e raiz contra catepsinas K, L e V (NASCIMENTO, 2014) e atividade inseticida do extrato etanólico das folhas contra pulgão-preto (*Aphis craccivora*) (BANDEIRA et al., 2012).

3.5 FLAVONOIDES

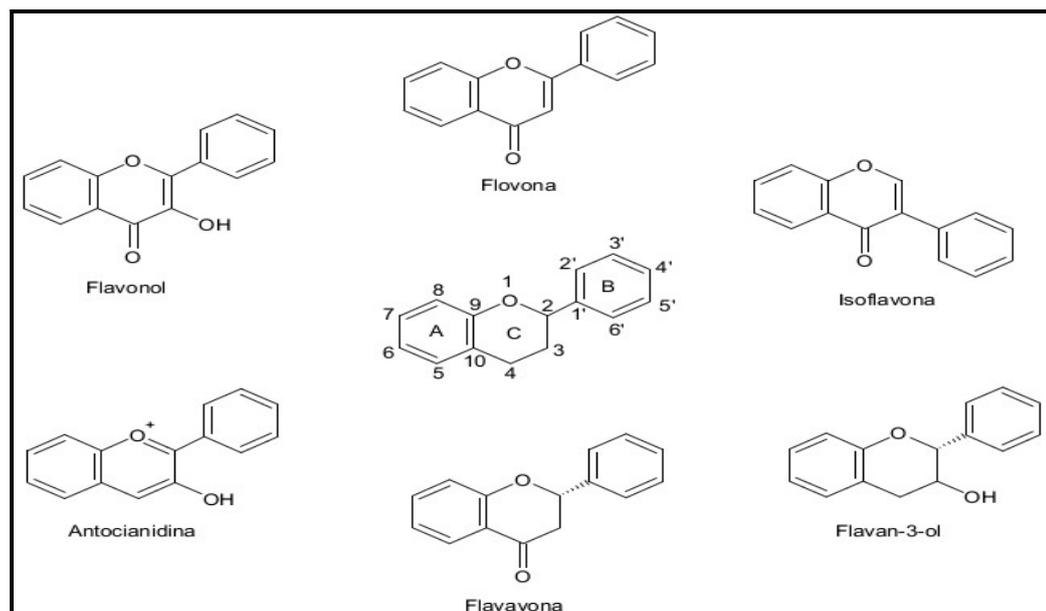
Os flavonoides constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários universalmente distribuídos entre as plantas vasculares. Embora alguns flavonoides ocorram naturalmente em formas livres de açúcares, a maioria existe na forma glicosídica (WINK, 2010). Segundo Buckingham e Munasinghe (2015) podem ser encontrados em musgos e hepáticas (tendo uma única ocorrência relatada em uma alga verde). Eles ocorrem em todas as classes de plantas superiores, exceto nas *anthocerotophytas* primitivas (*Anthocerotae*).

Estes metabólitos são derivados da condensação de um ácido cinâmico com três grupos de malonil-CoA. Todos os flavonoides surgem a partir desta reação inicial, a qual é catalisada pela enzima chalcona sintase. Esta, por sua vez, é normalmente convertida em um fenilbenzopirano, cuja modificação adicional fornece uma variedade de flavonoides (BLOOR, 2001).

Quimicamente, os flavonoides são compostos fenólicos, heterosídeos, com quinze átomos de carbono, com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte com três carbonos, C6-C3-C6, as quais são divididas em três unidades A, B e C (**Figura 4**), sendo encontrados principalmente na epiderme de folhas e na pele de frutos. As

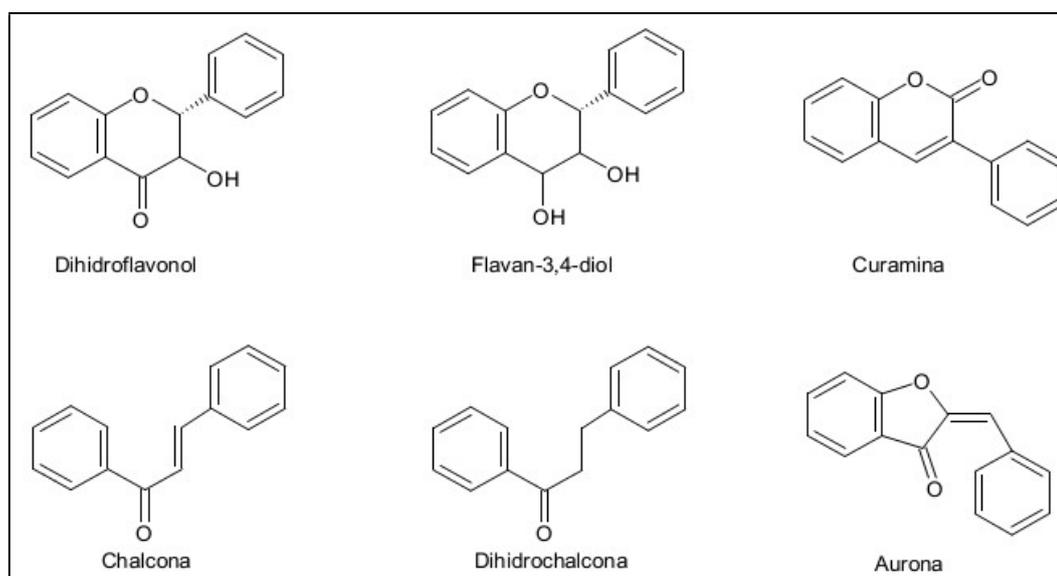
principais classes de flavonoides são as flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (**Figura 4**). Outros grupos, quantitativamente menores, são os dihidroflavonóis, flavan-3,4-dióis, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas e auronas (**Figura 5**) (CROZIER, CLIFFORD e ASHIHARA, 2006).

Figura 4 - Estruturas genéricas dos principais flavonoides



Fonte: Adaptado de Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

Figura 5 - Estruturas de outros flavonoides



Fonte: Adaptado de Crozier, Clifford e Ashihara (2006).

Estes metabólitos são importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois apresentam papéis essenciais às mesmas, como proteção contra raios ultravioleta, pigmentação, fixação de nitrogênio, modulação enzimática, ação alelopática, atração e repulsão de insetos, guias de néctar, nodulação em plantas leguminosas, proteção contra vírus, fungos e bactérias (ANDERSEN e MARCKHAM, 2006). Outra contribuição dos flavonoides para as plantas é em relação à coloração das mesmas, onde o amarelo é devido à presença de chalconas e flavonóis; e vermelho, azul e violeta decorrente das antocianidinas (DEWICK, 2009).

Além de serem essenciais às plantas, os flavonoides também o são para o ser humano, uma vez que são os principais componentes das plantas que formam sua base alimentícia, o que reforça a necessidade de investigações sobre o seu metabolismo e toxicologia. Ainda mais, pelo fato de serem os contribuintes ativos majoritários para os efeitos saudáveis dos alimentos, tais como frutas, legumes, chá e vinhos tintos, onde suas atividades estão associadas principalmente ao potencial de eliminação de radicais e atividades antioxidantes (BUCKINGHAM e MUNASINGHE, 2015).

Em relação à importância desses metabólitos para a humanidade, Azimova e Vinogradova (2013) destacam que estes têm atraído a atenção de pesquisadores por décadas, tais como químicos, farmacêuticos, fisiologistas, geneticistas de plantas, fitopatologistas e outros especialistas, devido à ação de compostos fisiologicamente ativos com um alto espectro de ação. Deste modo, acarretando, portanto, em um grande volume de literatura sobre isolamento, identificação, elucidação estrutural e, sobretudo, acerca das atividades biológicas destes metabólitos.

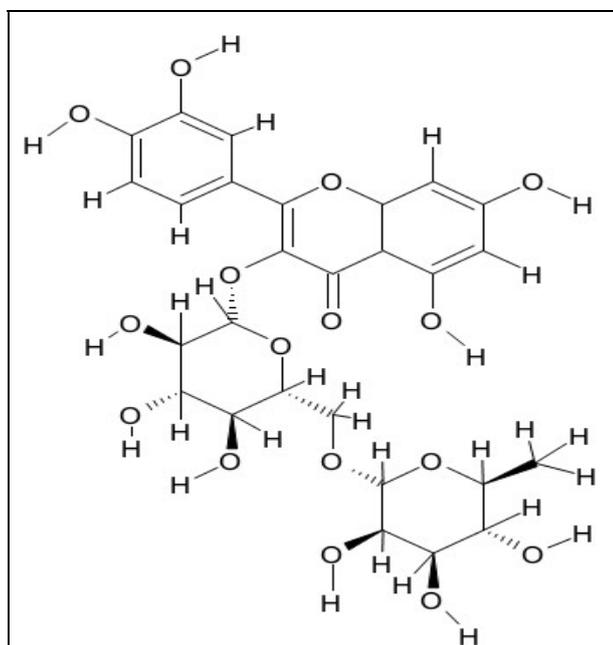
Dentre as atividades biológicas atribuídas para essa classe de metabólitos tem-se a regulação da atividade vascular e endotelial, a prevenção contra as doenças de Alzheimer e Parkinson, a inibição de neuroinflamações, no tratamento do câncer de boca, redução de danos ao DNA e até mesmo o aumento no desempenho cognitivo (SPENCER e CROZIER, 2012).

Estudos mais recentes apontam atividades no tratamento do câncer, inibição de vias inflamatórias, efeito antinocicentivo, efeito antiviral e bacteriostático (GARCÍA, RIEGER-REYES e SAZ-PEIRO, 2012; CHEN e CHEN, 2013; HOENSCH e OERTEL, 2015; RAUL et al., 2015; AHAMD et al., 2015).

Gil e Coutro (2013) apontam que as atividades biológicas dos flavonoides, principalmente as anti-inflamatórias e antineoplásicas estão intrinsecamente relacionadas ao potencial antioxidante dos mesmos, reiterando, a necessidade de estudos referentes à sua eletroquímica de oxidação.

Dentre os flavonoides mais importantes, pode-se destacar a rutina (**Figura 6**), alvo de estudo deste trabalho, que além de ser um dos principais marcadores de plantas, apresenta inúmeras aplicabilidades etnofarmacológicas, haja vista que é um flavonoide amplamente consumido a partir de vários tipos de bebidas e comidas. Tãmanha é sua importância que atualmente mais de 130 preparações medicinais terapêuticas contém rutina em suas formulações, certamente pelo fato deste composto apresentar atividades farmacológicas significantes, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, antiadipogênica, neuroprotetora e em terapias hormonais (CHUA, 2013); além de relatos de atividades antifúngicas (OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura química da rutina



Fonte: Adaptado de Ganeshpurkar e Saluja (2016).

A importância da rutina, também conhecida como vitamina P e rutosídeo, pode ser evidenciado em Ganeshpurkar e Saluja (2016), o qual elucida o potencial deste metabólito, principalmente como nutracêutico que além das atividades

supracitadas, ainda podem ser atribuídas à rotina, prevenção de neuroinflamações, promoção da sobrevivência das células da crista neural, atividade sedativa, anticonvulsivante, efeitos antidepressivos, antiderrame, antiartrítico, anti-hipercolesterolêmico, contra hipertensão, anticoagulante, antiúlcera, antiasmático, antiosteopênico e efeito fotoprotetor.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação do marcador rutina no extrato bruto e extrato seco de *Erythroxyllum suberosum* A. St. Hil. (*Erythroxyllaceae*), bem como desenvolver um derivado vegetal microencapsulado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação da espécie *E. suberosum* A. St. Hil.;
- Produzir o extrato bruto etanólico de *E. suberosum* A. St. Hil.;
- Validar a metodologia analítica de quantificação do marcador rutina no extrato bruto etanólico e extrato seco de *E. suberosum* A. St. Hil.;
- Produzir o extrato seco por atomização (*spray drying*) utilizando o adjuvante de secagem maltodextrina;
- Realizar o estudo de fotoestabilidade do extrato seco;
- Caracterizar as micropartículas por microscopia eletrônica de varredura, quanto à morfologia;
- Quantificar o marcador no extrato seco encapsulado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de folhas, referentes ao 3° e 4° nós dos ramos de *E. suberosum* foram coletadas em março de 2017 em região de cerrado *sensu stricto* precisamente na Reserva Biológica da Trilha do Tatu/UEG, no geoposicionamento de 16°22'55.4" S e 48°56'40.5" W. A espécie foi identificada pela Prof^a.Dr^a. Giuliana Vila Verde. A excisada do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (HUEG) sob o número de tombo: 11062.

A secagem do material coletado foi realizada em estufa de ventilação forçada a 45°C (MA035 – Marconi[®]), durante 5 dias. Em seguida as folhas foram pulverizadas em moinho Willey (tipo cróton MA-580). O pó (980,0g) resultante foi reservado para processo de maceração e consequente preparação do extrato bruto.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Caracterização do material vegetal

As análises abaixo seguiram conforme os procedimentos da Farmacopeia Brasileira 5. Edição (2010).

5.2.1.1 Análise microscópica dos pós

Com o auxílio de um bastão, transferiu-se uma pequena quantidade do material vegetal para uma lâmina e pingou uma gota do reagente de Steinmetz. As estruturas visualizadas foram comparadas com os parâmetros estabelecidos na literatura. O reagente de Steinmetz foi utilizado com uma mistura de hipoclorito de sódio, água ou glicerol-etanol.

5.2.1.2 Pesquisa de material estranho

Pesou-se 100g de amostra e espalhou-se sobre uma superfície lisa. O material estranho foi observado a olho nu e com auxílio do microscópio. Separou-se o material estranho encontrado, pesou-se e calculou-se a porcentagem em relação à massa da amostra analisada.

5.2.1.3 Determinação do teor de cinzas

Foram colocadas 3 g da amostra de pó das folhas pulverizadas de *E. suberosum* em três cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras foram incineradas a 600 °C, durante 4 h em mufla modelo (QUIMIS®) até a obtenção das cinzas. Após serem resfriados em dessecador os cadinhos foram pesados novamente e a partir da massa obtida calculou-se a porcentagem de cinzas. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada teste e representados pela média e desvio padrão. As análises seguiram conforme os procedimentos da literatura.

5.2.1.4 Análise Granulométrica

Uma amostra de 25 g do pó das folhas pulverizadas foi pesada em balança analítica e colocada sobre um conjunto de tamises de aço inox (Granutest®) composto de malhas de 350; 250; 150; 106 e 75 µm, provido de tampa e recipiente para a coleta do pó. O conjunto de tamises foi posicionado sobre agitador mecânico (Produtest®), submetido a vibrações em velocidade padronizada por 20 min. Em seguida, as porções de pó retidas em cada um dos tamises foram pesadas separadamente para avaliar o tamanho das partículas e classificá-las de acordo com a literatura oficial.

5.2.1.5 Determinação da perda por dessecação

A determinação da quantidade de água presente droga vegetal foi realizada utilizando balança de infravermelho (Shimadzu®). Cerca de 1 g do pó das folhas foi utilizado em cada análise. A determinação foi realizada em triplicata. A temperatura máxima atingida pela balança de infravermelho durante as análises foi de 105 °C. A perda por dessecação foi registrada e a porcentagem expressa como média e desvio padrão dos valores encontrados.

5.2.1.6 Determinação do perfil cromatográfico de *E. suberosum* por cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Aproximadamente 500 mg da droga vegetal foram submetidos à extração com 50 mL de metanol P.A. por 30 min em ultrassom (Unique®- Modelo:USC - 4800). Em seguida filtrou-se 1mL da amostra em filtro (Millex - Millipore®) 0,45µm e reservado para aplicação. Pesou-se o equivalente à 20mg (massa corrigida para 100%) do padrão de rutina (Sigma Aldrich®- 95%) para balão volumétrico âmbar de 10mL e em seguida completado o volume com metanol, levando-se ao ultrassom até completa solubilização. Foram aplicadas 20µL da solução da amostra e do padrão de rutina com o auxílio de um pipetador automático (HandyStep®) na extremidade inferior de uma cromatoplaça de alumínio impregnada com sílica gel 60F254 (Merck®). A cromatoplaça foi colocada em uma cuba cromatográfica previamente saturada com o vapor de metanol P.A. como fase móvel. Após a eluição, a cromatoplaça foi seca à temperatura ambiente e revelada com cloreto férrico 1%. A análise foi realizada através da comparação das características do Rf da banda da amostra com o da banda do padrão de rutina.

5.2.1.7 Determinação do teor de rutina

A quantificação de rutina no material vegetal foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com os parâmetros

cromatográficos estabelecidos na validação do método para determinação do teor de rutina no extrato bruto de *E. suberoum*. Pesou-se 250 mg do material vegetal pulverizado para balão volumétrico âmbar de 50mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi levada ao ultrassom por 30min. O padrão de rutina foi preparado pesando-se 20 mg para balão volumétrico âmbar de 100mL e em seguida completado o volume com metanol, levando-se ao ultrassom até completa solubilização. As soluções foram filtradas para *vial* âmbar em filtro (Millex - Millipore®) 0,45µm e analisadas por CLAE. A determinação do teor de rutina no material vegetal foi realizada em duplicata e a sua identificação e quantificação realizada através de comparação da área e tempo de retenção em relação à solução padrão de rutina.

5.3 Obtenção do extrato bruto

O material pulverizado (980,0g) foi acondicionado em dois erlenmeyers de 2 litros cada, em processo de maceração a frio com etanol 96°GL e protegido da luz, por um período de uma semana, para que se iniciasse o processo de extração dos compostos químicos da planta de acordo com Matos (1988), Matos e Matos (1989).

Após o tempo previamente determinado, a solução extratora foi filtrada para remoção de partículas e o solvente orgânico separado em rotoevaporador (TECNAL®-120) em temperatura aproximada de 40°C para evitar a degradação dos compostos termolábeis.

5.4 Obtenção do extrato seco e preparação das micropartículas por *spray drying*

A técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) para formação de micropartículas foi testada utilizando o adjuvante maltodextrina. A solução foi preparada pesando-se 32,40 g de extrato bruto para béquer de 1000 mL, em seguida sob agitação foi adicionado 200 mL de álcool etílico 96°GL e completado o volume com água para 600 mL. As partículas sólidas precipitadas foram separadas

por filtração em papel filtro quantitativo faixa preta. O volume total foi particionado em seis frações de 100mL cada. O adjuvante de secagem maltodextrina foi adicionado perfazendo cinco preparações de concentração (0,32%; 0,64%; 1,60%; 3,20% e 4,80%) m/v de extrato fluido. Foi preparada uma amostra controle sem adição do adjuvante, sendo a primeira fração a ser secada, seguida das menores concentrações em ordem crescente.

As condições de análise utilizadas na secagem por nebulização do extrato fluido foram determinadas segundo os parâmetros: temperatura da câmara de secagem (120°C); temperatura de saída (90°C); vazão do ar de atomização (4,50L/minuto) e vazão de alimentação do extrato (0,30mL/minuto) no Quadro 1.

As soluções contendo o extrato bruto de *E. suberosum* foram inseridas no aparelho através de mangueira de silicone e bomba peristáltica. Posteriormente, a solução foi nebulizada em câmara dessecadora para evaporação do solvente. As micropartículas formadas durante a secagem foram armazenadas em recipiente coletor próprio do aparelho (MENDEZ, 2011).

Quadro 1. Parâmetros de operação do *spray dryer*

Vazão do ar comprimido	4,50 L/min
Temperatura da Câmara de Secagem	120°C
Temperatura de Saída	90°C
Velocidade da bomba de sucção	0,30 mL/min
Diâmetro do Bico Atomizador	1,2mm

5.5 Validação da metodologia analítica de quantificação de rutina no extrato bruto e no extrato seco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método analítico de determinação do teor de rutina no extrato bruto e no extrato seco de *E. suberosum* foi validado em conformidade com a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003), sendo avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

5.5.1 Sistema cromatográfico - Adequação do Sistema (*System Suitability*)

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent®), com sistema de bomba quaternária (Mod.:G1311B), detector de arranjo de diodos (DAD) (Mod.:G4212B), compartimento de coluna (Mod.:G1316A), amostrador automático (Mod.:G1329B) e sistema de gerenciamento e processamento de dados OpenLab®. A coluna cromatográfica utilizada foi Agilent Eclipse XDB C18 (250 x 4,6mm, 5µm). Os parâmetros cromatográficos de adequabilidade do sistema (*System suitability*) (Quadro 2), avaliados nas soluções padrão de rotina foram: Fator de Cauda; Desvio Padrão Relativo (DPR) e Número de Pratos Teóricos.

Quadro 2. Parâmetros de aceitação de Adequabilidade do Sistema

Teste	Solução	Parâmetros	Critérios de Aceitação
Adequabilidade do Sistema	Solução Padrão	Fator de Cauda	≤ 2,0%
		DPR	≤ 2,0%
		Pratos Teóricos	Mínimo 2000

5.5.2 Determinação das condições de operação do sistema cromatográfico

O método desenvolvido para a determinação de rotina no extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* foi sob condição de gradiente de fase móvel (Quadro 3), com uma mistura de solvente A (água acidificada com 1% (v / v) de ácido acético) e solvente B (acetonitrila) com um fluxo constante de 1,5 mL/minuto. O volume de injeção foi de 10 µL em todas as análises. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 254nm após varredura de 210 a 400nm para determinação da melhor faixa de absorção. A coluna cromatográfica foi mantida a uma temperatura de 40°C. O solvente metanol foi utilizado como diluente na preparação das amostras e dos padrões. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45µm (Millex - Millipore®).

Quadro 3. Gradiente de Fase Móvel

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	88	12
15	88	12
25	87	13
35	84	16
40	88	12

5.5.3 Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise comparativa entre os cromatogramas obtidos pela varredura de 210 a 400 nm da solução diluente metanol, da solução padrão de rutina à 0,2mg/mL para quantificação de rutina no extrato bruto de *E. suberosum*; da solução padrão de rutina à 0,4mg/mL para quantificação de rutina no extrato seco e as soluções amostra de extrato bruto e extrato seco preparadas conforme abaixo. A seletividade do método foi avaliada através da resolução entre os picos detectados e da pureza de cada pico.

Preparo da solução padrão de rutina à 0,2mg/mL (Quantificação de rutina no extrato bruto de *E.suberosum*):

Pesou-se 20mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 100mL e completou-se o volume com metanol. A preparação foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos e em seguida filtrada em membrana de 0,45µm (Millex-Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração de rutina: 0,2mg/mL

Preparo da solução padrão de rutina à 0,4mg/mL (Quantificação de rutina no extrato seco de *E.suberosum*):

Pesou-se 40mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 100mL e completou-se o volume com metanol. A preparação foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos e em seguida filtrada em membrana de 0,45µm (Millex-Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração de rutina: 0,4mg/mL

Preparo da solução amostra de extrato bruto de *E. suberosum*:

Pesou-se 250mg do extrato bruto para balão volumétrico âmbar de 50mL e completou-se o volume com metanol. A preparação foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos e em seguida filtrada em membrana de 0,45 μ m (Millex-Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração do extrato bruto de *E. suberosum*: 5,0mg/mL

Preparo da solução amostra de extrato seco de *E. suberosum*:

Pesou-se 250mg do extrato seco para balão volumétrico âmbar de 50mL e completou-se o volume com metanol. A preparação foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos e em seguida filtrada em membrana de 0,45 μ m (Millex-Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração do extrato seco de *E. suberosum*: 5,0mg/mL

5.5.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da regressão linear e do cálculo do coeficiente de correlação linear (r). Para a determinação da linearidade foi necessária a obtenção de três curvas de calibração obtidas em três dias diferentes da solução padrão com 7 pontos (30%; 50%; 70%; 80%; 100%; 110% e 120%). A partir de uma solução mãe de 1,0mg/mL de rutina em metanol, preparou-se diluições sucessivas nas concentrações de 0,12mg/mL a 0,48mg/mL constituindo o intervalo linear. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μ m (Millex-Millipore®) e injetadas em triplicata no cromatógrafo.

5.5.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado através do cálculo da relação sinal ruído do ativo rutina nas soluções diluídas, pelo processador de dados OpenLab®,

preparadas à partir de uma solução mãe de 0,4mg/mL de rutina em metanol, (0,04mg/mL; 0,02mg/mL; 0,008mg/mL; 0,004mg/mL; 0,002mg/mL; 0,0008mg/mL e 0,0004mg/mL), filtradas em membrana de 0,45µm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. A solução que apresentou a relação sinal ruído acima de 10, determinou o limite de quantificação. Foram preparadas 6 amostras na concentração do limite de quantificação determinado e avaliado o Desvio Padrão Relativo (DPR). Considerou-se o Desvio Padrão Relativo (DPR) até $\leq 5\%$ (BRASIL, 2003).

5.5.6 Precisão

A precisão foi realizada com seis determinações da amostra de extrato bruto e seis determinações da amostra de extrato seco de *E. suberosum* na concentração de 5,0 mg/mL e quantificadas com as soluções padrão de rutina preparadas conforme o teste de seletividade. As amostras foram preparadas pesando-se individualmente 250mg do extrato bruto e 250 mg do extrato seco para balão volumétrico âmbar de 50 mL e completado o volume com metanol. As preparações foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45µm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. A repetibilidade foi avaliada por meio do Desvio Padrão Relativo (DPR) entre seis preparações. Considerou-se o Desvio Padrão Relativo (DPR) até $\leq 5\%$ (BRASIL, 2003).

5.5.7 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da técnica de adição de padrão, nas concentrações baixa, média e alta, sendo realizada em triplicata e avaliada sua recuperação quando adicionado o padrão de rutina à matriz (extrato bruto) e a matriz (extrato seco) de *E. suberosum*, sendo denominadas de amostras fortificadas.

5.5.7.1 Exatidão extrato bruto

Realizou-se o preparo da matriz (extrato bruto) a 50% da concentração de trabalho (2,5mg/mL) da amostra e adicionou-se nesta volumetricamente concentrações de solução padrão de rutina (0,04mg/mL; 0,1mg/mL e 0,14mg/mL), equivalentes a (20%; 50% e 70%) de adição de padrão teórico, onde somadas à 50% na matriz, resultaram em 70%; 100% e 120% (0,14mg/mL; 0,2mg/mL e 0,24mg/mL) da concentração de trabalho da solução padrão para quantificação de rutina no extrato bruto (0,2mg/mL). As preparações seguem conforme descrito abaixo:

Preparo da Solução Matriz (extrato bruto) à 50% da concentração de trabalho:

Pesou-se 250mg do extrato bruto para balão volumétrico âmbar de 50mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos (Solução Matriz Estoque: 5,0mg/mL). Pipetou-se 5mL da preparação anterior para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm (Millex -Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração: 2,5mg/mL.

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 20% (70% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 40mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 100mL e completando-se o volume com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 1mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,04mg/mL

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 50% (100% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 50mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 50mL e completando-se o volume com

metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 1mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,1mg/mL

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 70% (120% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 70mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 50mL e completando-se o volume com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 1mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,14mg/mL.

5.5.7.2 Exatidão extrato seco

Realizou-se o preparo da matriz (extrato seco) a 50% da concentração de trabalho (2,5mg/mL) da amostra e adicionou-se nesta volumetricamente concentrações de solução padrão de rutina (0,08mg/mL; 0,2mg/mL e 0,28mg/mL), equivalentes a (20%; 50% e 70%) de adição de padrão teórico, onde somadas à 50% na matriz, resultaram em 70%; 100% e 120% (0,28mg/mL; 0,4mg/mL e 0,48mg/mL) da concentração de trabalho da solução padrão para quantificação de rutina no extrato seco (0,4mg/mL).

Preparo da Solução Matriz (extrato seco) à 50% da concentração de trabalho:

Pesou-se 250mg do extrato seco para balão volumétrico âmbar de 50mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos (Solução Matriz Estoque: 5,0mg/mL). Pipetou-se 5mL da preparação

anterior para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm (Millex -Millipore®) e injetada no cromatógrafo. Concentração: 2,5mg/mL.

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 20% (70% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 40mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 100mL e completando-se o volume com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 2mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,08mg/mL

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 50% (100% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 50mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 50mL e completando-se o volume com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 2mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,2mg/mL

Preparo da Solução Matriz à 50% com adição de padrão de rutina à 70% (120% da Concentração de Trabalho)

Preparou-se individualmente três amostras, pesando-se 70mg do padrão de rutina para balão volumétrico âmbar de 50mL e completando-se o volume com metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Pipetou-se 2mL da preparação anterior e 5mL da Solução Matriz Estoque para balão volumétrico âmbar de 10mL e completou-se o volume com metanol. As amostras

foram filtradas em membrana de 0,45 μm (Millex-Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Concentração do padrão de rutina adicionada: 0,28mg/mL.

5.5.8 Robustez

A robustez foi avaliada através do resultado de teor do extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* mediante pequenas variações das condições cromatográficas, conforme apresentado no Quadro 4, avaliando o Desvio Padrão Relativo (DPR) das preparações no mesmo parâmetro analítico (temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e lote da coluna cromatográfica) com critério de aceitação de DPR: $\leq 2,0$. As soluções padrão de rutina e as soluções amostra de extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* foram preparadas conforme o teste de seletividade.

Quadro 4. Parâmetros analíticos utilizados na verificação de robustez da metodologia analítica para determinação do teor de rutina no extrato bruto/seco por CLAE-DAD

Parâmetros	Condição 1	Condição Normal	Condição 2
Fluxo da fase móvel	1,4mL/min	1,5mL/min	1,6mL/min
Temperatura da Coluna	38°C	40°C	42°C
Lote da coluna cromatográfica	LN B13208	LN B13203	-

5.6 Análise do extrato seco encapsulado

O encapsulado foi avaliado em dois aspectos, a saber: a sua morfologia e quanto ao teor de rutina.

Quantificação da rutina no extrato seco encapsulado

A quantificação da rutina foi realizada após a validação da metodologia analítica de quantificação no extrato seco de *E. suberosum*. As amostras de extrato seco encapsuladas foram preparadas pesando-se 50mg de cada teste (0,32%;

0,64%; 1,60%; 3,20% e 4,80% m/v de maltodextrina / extrato bruto) e uma amostra controle, sem a adição de maltodextrina, para balão volumétrico âmbar de 10mL e completado o volume com metanol, resultando em uma concentração de 5,0mg/mL. As amostras foram levadas ao ultrassom por 30min. As soluções foram filtradas para *vial* âmbar em filtro (Millex - Millipore®) 0,45µm e analisadas por CLAE. A determinação do teor de rutina nas amostras encapsuladas foi realizada através de comparação da área e tempo de retenção em relação à solução padrão de rutina na concentração de 0,4mg/mL preparada conforme teste de seletividade descrito anteriormente.

As soluções foram injetadas no cromatógrafo líquido (Agilent®, composto pelos módulos: Amostrador automático (Mod: G1329B); bomba quaternária (Mod: G1311B); detector DAD (Detector de Arranjo de Diodos): (Mod: G4212B) e compartimento de coluna (Mod: G1316A).

Análise de fotoestabilidade do extrato seco encapsulado

As amostras de extrato seco encapsuladas (0,32%; 0,64%; 1,60%; 3,20% e 4,80% m/v de maltodextrina / extrato bruto) e uma amostra protegida em papel alumínio (controle), foram expostas em câmara de fotoestabilidade (Nova Ética® modelo 424CF) por um período de 48hrs, equivalente a 1,2mihões de lux.hora e temperatura controlada de 25°C. A fotoestabilidade do extrato seco encapsulado foi avaliada comparando-se o teor inicial do marcador rutina e o teor após exposição. A solução padrão de rutina, amostra controle e amostras expostas na câmara foram preparadas conforme teste de seletividade e analisadas por CLAE.

Caracterização das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura

Amostras do microencapsulado foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (HITACHI® TM-3030 PLUS). Neste processo, as amostras foram colocadas sobre uma superfície de carbono, não sendo necessária nenhuma

preparação prévia. Micrografias das amostras foram obtidas através da inspeção da morfologia da superfície das micropartículas através de imagens da topografia e profundidade do extrato seco analisado.

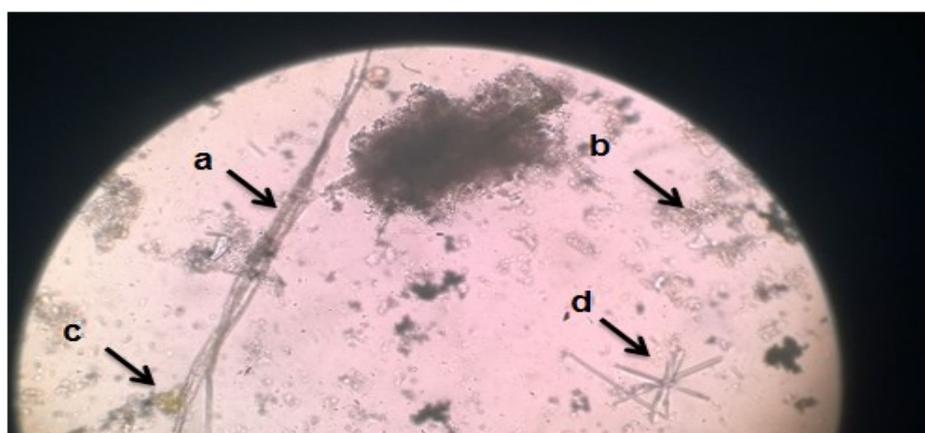
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização do material vegetal

6.1.2 Análise Microscópica dos pós

Foram observados na análise microscópica do pó de *Erythroxylum suberosum* (Figura 7), as seguintes estruturas: Pêlo tector; parênquima paliçádico; células com substância lipídica e cristais.

Figura 7. Fotomicrografia do pó de *Erythroxylum suberosum*



Legenda: Fotomicrografia de microscopia óptica em aumento de 40x. Fragmentos de estruturas da folha no pó. a- Pêlo tector; b- parênquima paliçádico; c- células com substância lipídica; d- cristais.

Fonte: próprio autor.

6.1.3 Pesquisa de material estranho

O teor de material estranho encontrado foi de 0,8%, resultado devido ao cuidado na coleta, na qual as folhas foram coletadas manualmente e reservadas em saco plástico apropriado para posterior etapa de secagem.

6.1.4 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas inclui as cinzas fisiológicas e as cinzas não fisiológicas, sendo um parâmetro de pureza e específico para cada espécie vegetal. Representam a fração de sílica e outros materiais silicosos que podem estar presentes na amostra analisada. Por esta análise, procedimentos mal sucedidos de coleta e estocagem inadequada podem ser identificados.

Assim, diante das análises obteve-se a média de 10,49 %, cuja descrição ainda não foi encontrada na literatura.

6.1.5 Análise Granulométrica

A malha que obteve a maior proporção de massa retida foi a malha de 350 μ m, com 94,84% (Tabela 1). O resultado classifica o pó como grosso, de acordo com a especificação que determina a passagem máxima de 40% do pó por tamis de abertura nominal 355 μ m. Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010).

Tabela 1. Resultado da análise granulométrica do pó das folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil

Malha (μ m)	Massa (gramas)	Proporção (%)
350	23,71	94,84
250	0,75	3,0
150	0,42	1,68
106	0,08	0,32
75	0,04	0,16

6.1.6 Determinação da perda por dessecação

O teor de voláteis no pó das folhas pulverizadas de *E. suberosum* foi de 7,04%, portanto encontra-se abaixo do limite máximo permitido de 14% preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

6.1.7 Determinação do perfil cromatográfico do pó das folhas de *E. suberosum* por cromatografia em camada delgada (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada é uma técnica rápida, simples e de baixo custo na separação e identificação de marcadores químicos presentes em

matrizes vegetais complexas. A **Figura 8** mostra o perfil cromatográfico do pó das folhas pulverizadas de *E. suberosum* onde visualiza-se uma banda da amostra com mesmo Rf (0,87) da banda do padrão de rutina.

Figura 8 - Perfil cromatográfico (CCD) do pó das folhas de *E. suberosum* FM: metanol P.A



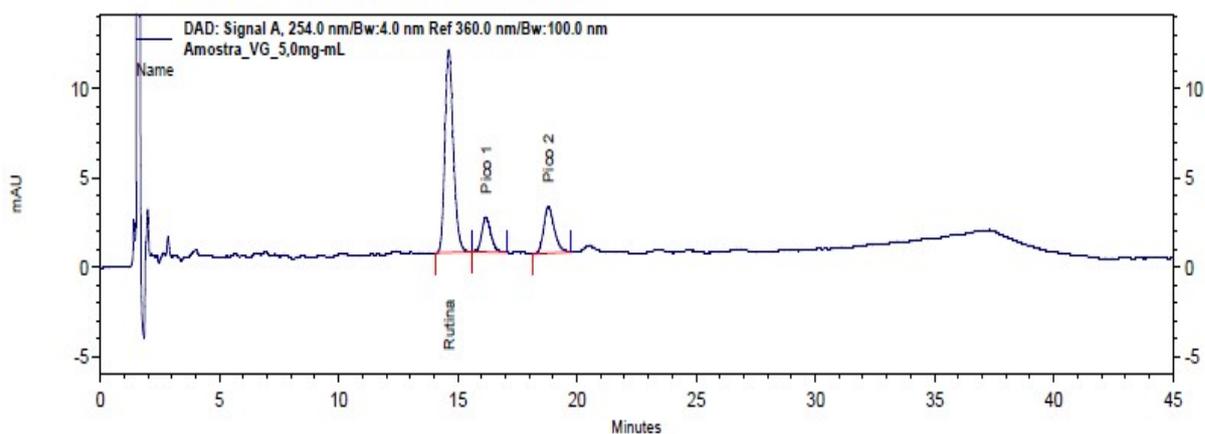
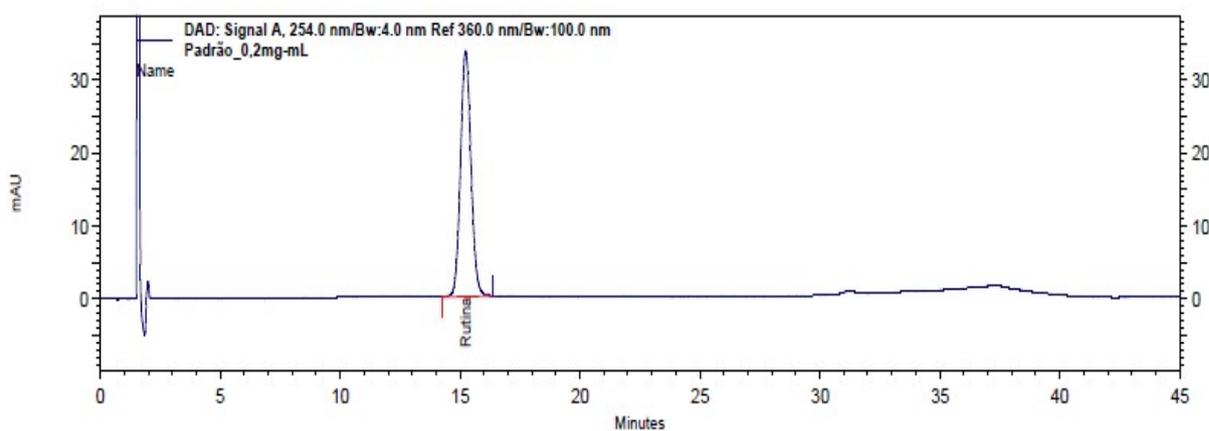
Fonte: Próprio autor

6.1.8 Determinação do teor de rutina no material vegetal por CLAE-DAD

O doseamento de rutina no pó das folhas de *E. suberosum* foi realizado a partir da integração de áreas do pico de rutina na solução amostra e solução padrão. O resultado para esta análise foi de 0,060mg/mL (Tabela 2). Os cromatogramas obtidos para a amostra do material vegetal e solução padrão de rutina e são mostrados nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente.

Tabela 2. Resultado do teor de rutina na amostra do pó das folhas de *E. suberosum*

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1		126441252	100,00
Padrão 2	0,20	127489314	100,00
Padrão 3		126325100	100,00
Média:		126751889	-
Desvio Padrão (DP):		641264	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,51 %	-
Injeções	Concentração da Amostra Vegetal (mg/mL)	Área de Rutina na Amostra Vegetal (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1		38641119	0,061
Amostra 2	5,0	37859623	0,060
Média:		0,060	
Desvio Padrão (DP):		0,0009	
Desvio Padrão Relativo (DPR):		1,44 %	

Figura 9 - Cromatograma solução amostra do pó das folhas de *E. suberosum***Figura 10 -** Cromatograma solução padrão de rutina 0,2mg/mL

6.2 Obtenção do extrato bruto

Após o término da etapa de rotoevaporação do solvente orgânico da amostra em maceração obteve-se um líquido viscoso denominado de extrato bruto etanólico com massa resultante de 217,98g e rendimento de 22,4%.

6.3 Obtenção do extrato seco

O extrato seco foi obtido por secagem do extrato bruto em *spray dryer* (Figura 11), seguindo os protocolos de Queiroz (2008). Foram produzidas 6 amostras de extrato seco de *E. suberosum*, no qual uma amostra controle foi preparada sem adição do adjuvante de secagem maltodextrina para referência.

Figura 11. Produção do extrato seco de *E. suberosum*



Fonte: Próprio autor

Tabela 3. Resultados do extrato seco de *E. suberosum* encapsulado

Extrato Bruto Etanólico (g)	Massa de Maltodextrina adicionada (g)	Massa Maltodextrina / Volume Extrato Bruto (100mL)	Massa de Extrato Seco produzido em gramas (g)
5,40	0,00	0,00%	0,522
5,40	0,32	0,32%	0,590
5,40	0,64	0,64%	0,609
5,40	1,60	1,60%	0,642
5,40	3,20	3,20%	0,706
5,40	4,80	4,80%	0,788
Total: 32,40 g	Total: 10,56 g		Total: 3,86 g

6.4 Validação da metodologia analítica de quantificação de rutina no extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* por CLAE-DAD

6.4.1 Adequação do sistema (*System Suitability*)

Na adequação do sistema cromatográfico foram avaliados os parâmetros de *System Suitability*: Fator de cauda; Pratos Teóricos e Desvio Padrão Relativo (DPR) para a replicatas de 5 injeções da solução padrão de rutina comprovando que o sistema está apto para o início da validação. Resultados conforme Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Resultados de adequação do sistema (*System Suitability*) extrato bruto

Injeções	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Fator de Cauda	Pratos Teóricos
Padrão 1	126352120	1,11	5742
Padrão 2	127451256	1,15	5810
Padrão 3	127784125	1,12	5863
Padrão 4	126852411	1,14	5785
Padrão 5	126547811	1,12	5736
Média:	126997545	1,13	5787
Desvio Padrão (DP):	605074	-	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):	0,48 %	-	-

Tabela 5. Resultados de adequação do sistema (*System Suitability*) extrato seco

Injeções	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Fator de Cauda	Pratos Teóricos
Padrão 1	254632145	1,14	5896
Padrão 2	255962784	1,18	5455
Padrão 3	256894783	1,12	5627
Padrão 4	254369742	1,15	5587
Padrão 5	255967432	1,14	5963
Média:	255565377	1,15	5706
Desvio Padrão (DP):	1047302	-	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):	0,41 %	-	-

6.4.2 Seletividade

Os perfis cromatográficos registrados revelaram um pico majoritário com tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos referente ao marcador rotina avaliado tanto na solução amostra do extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* quanto na solução padrão de rotina. Foram detectados ainda picos de menor intensidade nomeados como Pico 1 e Pico 2 com tempo de retenção aproximado de 16 e 18 minutos respectivamente, sendo integrados para cálculos de seletividade. O método apresentou cromatogramas com picos resolvidos conforme especificação de Resolução $\geq 2,0$. Os resultados de Pureza de Pico $\geq 0,98$ foram aprovados para Rutina; Pico 1 e Pico 2. A partir dos resultados apresentados comprova-se que o método é seletivo e não apresenta coeluição, ou seja, o sinal detectado corresponde apenas a um composto químico para determinado tempo de retenção.

O cálculo do Teor foi expresso em função da **Equação 1** e **Equação 2** onde:

C_{PD} = Concentração, em mg/mL, da solução padrão de rotina;

C_A = Concentração, em mg/mL, da solução amostra de extrato bruto / seco de *E. suberosum* (5,0mg/mL);

R_A = Área do pico de rotina obtida a partir da solução amostra de extrato bruto de *E. suberosum* em mAU;

R_{PD} = Área do pico de rotina obtida a partir da solução padrão de rotina em mAU.

$$\text{Teor (\%)}: (R_A / R_{PD}) \times (C_{PD} / C_A) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Teor (mg/mL)}: (\text{Teor\%}) \times C_A / 100 \quad \text{Equação 2}$$

A escolha do comprimento de onda de leitura das amostras de extrato bruto e extrato seco de *E. suberosum* foi definida após varredura do Detector DAD e avaliação dos picos detectados. Os picos 1 e 2 apresentaram absorção máxima em 254nm e o pico de rutina em 256nm. Para uma melhor detecção dos picos 1 e 2, estabeleceu-se o parâmetro em 254nm para desenvolvimento do método.

A seguir são apresentados os resultados referentes ao teste de seletividade da validação do extrato bruto de *E. suberosum*.

Tabela 6. Resultado de pureza de pico da solução padrão de rutina (0,2mg/mL)

Ativo	Área (mAU)	Tempo de Retenção (Minutos)	Pureza de Pico
Rutina	127981233	14,33	1,00

Tabela 7. Resultado de seletividade da amostra de extrato bruto de *E. suberosum*

Ativo	Área (mAU)	Tempo de Retenção (Minutos)	Resolução	Pureza de Pico
Rutina	122235219	14.50	0,00	1,00
Pico 1	18121140	16.06	2,31	0,99
Pico 2	31219734	18.69	3,51	1,00

Tabela 8. Resultado de teor do teste de seletividade do extrato bruto de *E. suberosum*

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1		127981233	100,00
Padrão 2	0,20	127411254	100,00
Padrão 3		127418541	100,00
	Média:	127603676	-
	Desvio Padrão (DP):	326994	-
	Desvio Padrão Relativo (DPR):	0,26 %	-
Injeções	Concentração do Extrato Bruto (mg/mL)	Área de Rutina na Amostra (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1		122235219	0,192
Amostra 2	5,0	121892251	0,191
	Média:		0,191
	Desvio Padrão (DP):		0,0004
	Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,20 %

Os cromatogramas e espectros a seguir, **Figuras 12 à 18**, são referentes ao teste de seletividade da validação do extrato bruto de *E. suberosum*.

Figura 12. Cromatograma da solução amostra do extrato bruto de *E. suberosum* 5,0mg/mL

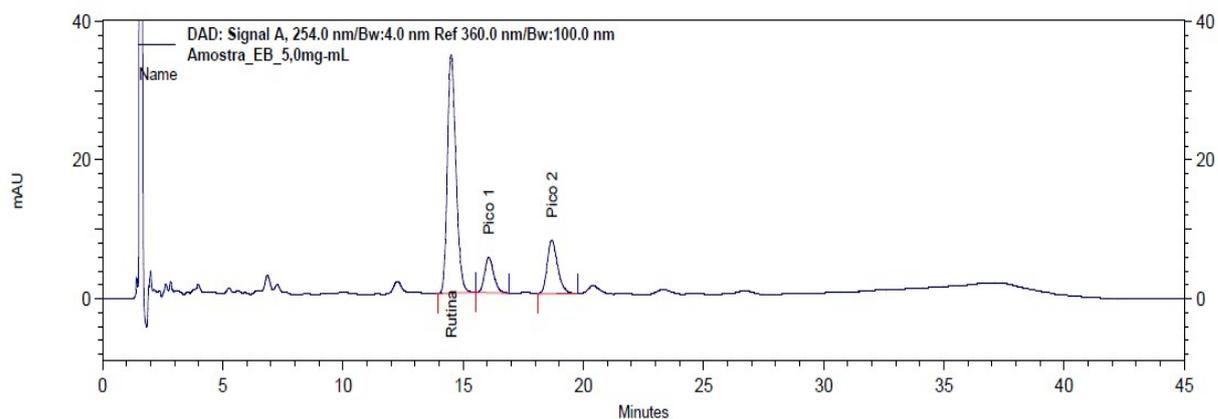


Figura 13. Cromatograma da solução padrão de rutina 0,2mg/mL

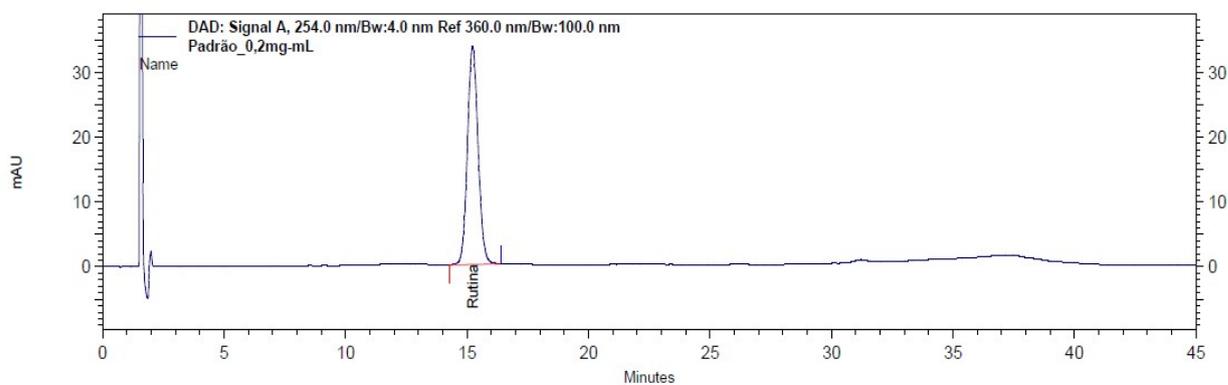


Figura 14. Cromatograma do diluente metanol

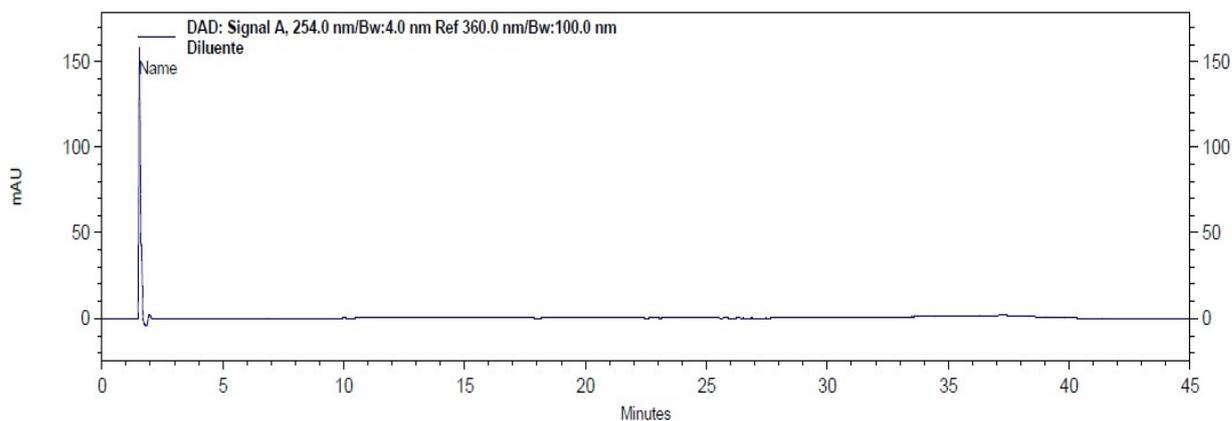


Figura 15. Espectro de absorção ultravioleta de rutina na solução padrão 0,2mg/mL

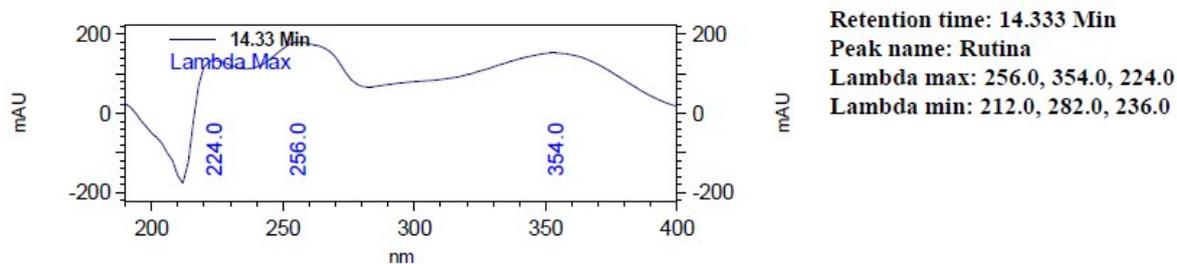


Figura 16. Espectro de absorção ultravioleta de rutina na solução amostra do extrato bruto de *E. suberosum*

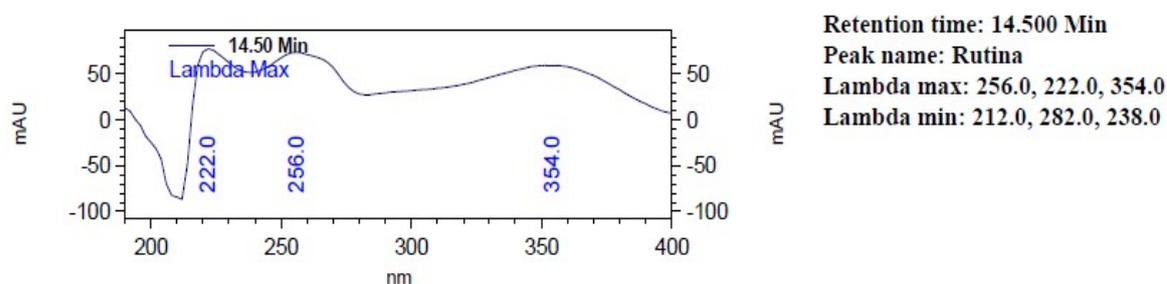


Figura 17. Espectro de absorção ultravioleta do Pico 1 da solução amostra do extrato bruto de *E. suberosum*

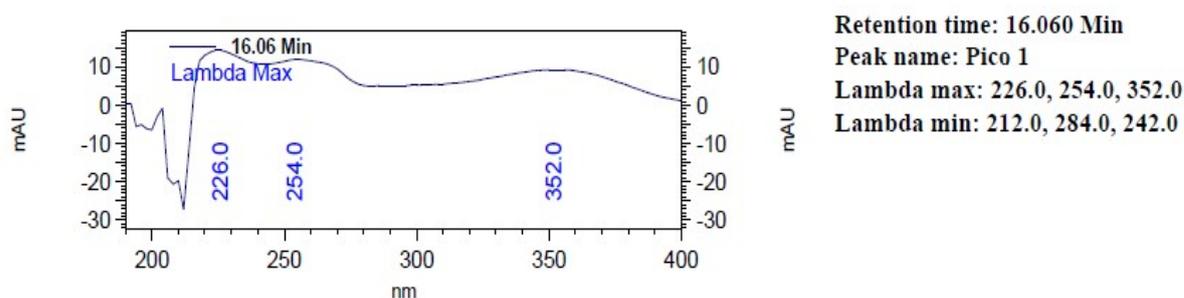
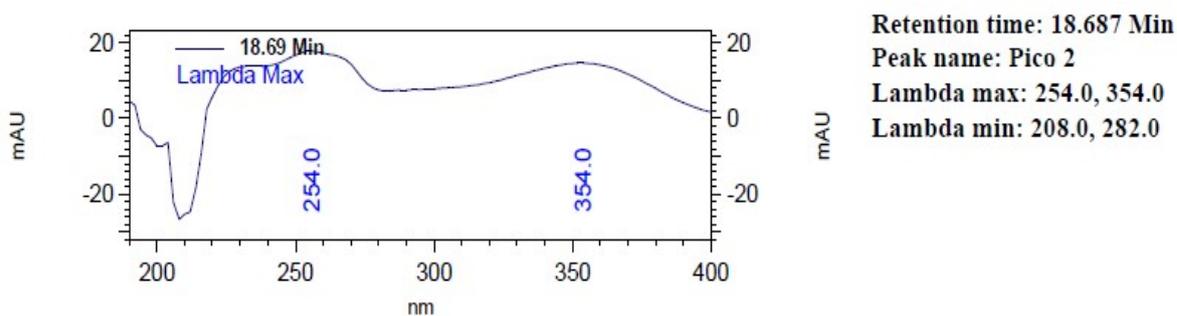


Figura 18. Espectro de absorção ultravioleta do Pico 2 da solução amostra do extrato bruto de *E. suberosum*



A seguir são apresentados os resultados referentes ao teste de seletividade da validação do extrato seco de *E. suberosum*.

Tabela 9. Resultado de pureza de pico da solução padrão de rutina (0,4mg/mL)

Ativo	Área (mAU)	Tempo de Retenção (Minutos)	Pureza de Pico
Rutina	254784102	14,79	1,00

Tabela 10. Resultados de seletividade da amostra de extrato seco de *E. suberosum*

Amostra Extrato Seco de <i>E. suberosum</i>	Área (mAU)	Tempo de Retenção (Minutos)	Resolução	Pureza de Pico
Rutina	254256128	14.58	0,00	1,00
Pico 1	39626903	16.08	2,32	1,00
Pico 2	66904733	18.67	3,51	1,00

Tabela 11. Resultado de teor do teste de seletividade do extrato seco de *E. suberosum*

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1		254784102	100,00
Padrão 2	0,40	255981457	100,00
Padrão 3		254556874	100,00
	Média:	255107478	-
	Desvio Padrão (DP):	765368	-
	Desvio Padrão Relativo (DPR):	0,30 %	-
Injeções	Concentração do Extrato Seco (mg/mL)	Área de Rutina na Amostra (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1		254256128	0,399
Amostra 2	5,0	256259713	0,402
	Média:		0,400
	Desvio Padrão (DP):		0,0022
	Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,56 %

Os cromatogramas e espectros a seguir, **Figuras 19 à 26**, são referentes ao teste de seletividade da validação do extrato seco de *E. suberosum*.

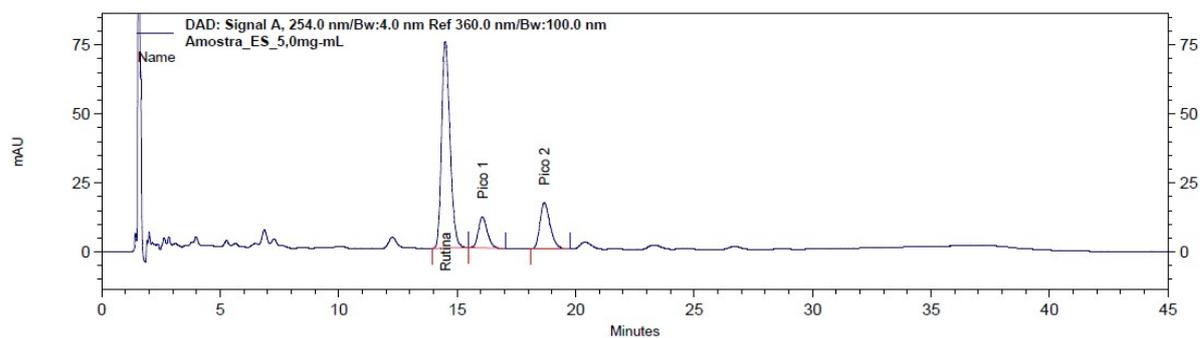
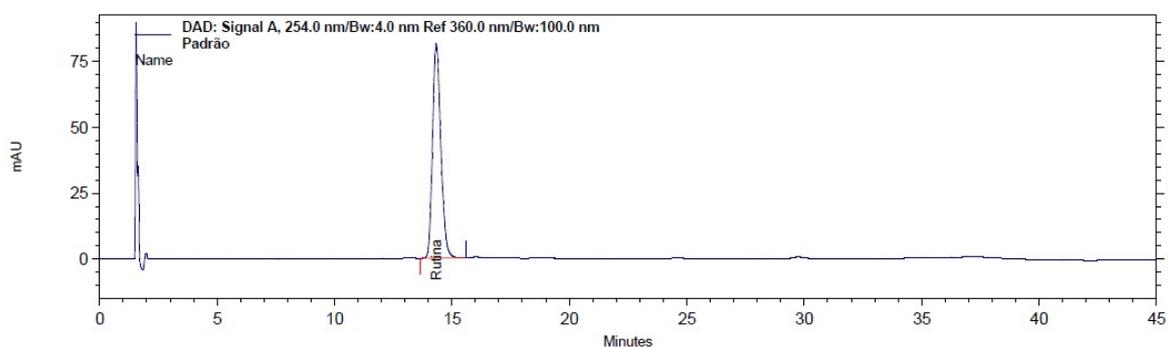
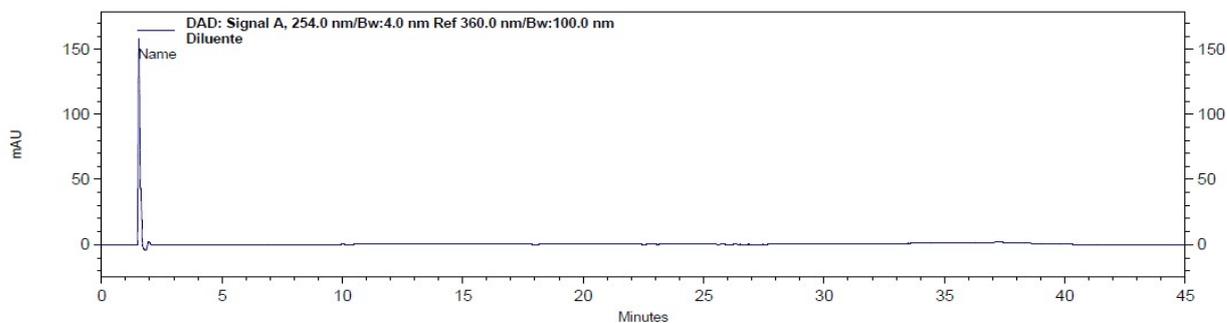
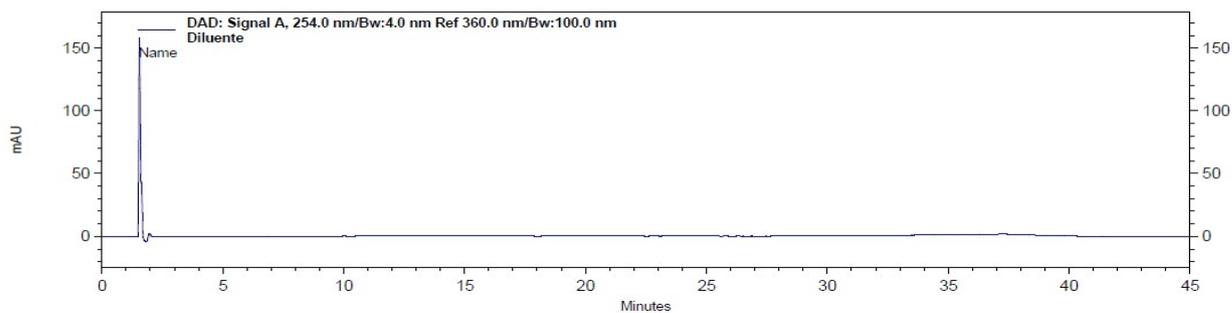
Figura 19. Cromatograma da solução amostra do extrato seco de *E. suberosum* 5,0mg/mL**Figura 20.** Cromatograma da solução padrão de rutina 0,4mg/mL**Figura 21.** Cromatograma do diluente metanol**Figura 22.** Cromatograma do adjuvante maltodextrina

Figura 23. Espectro de absorção ultravioleta de rutina na solução padrão 0,4mg/mL

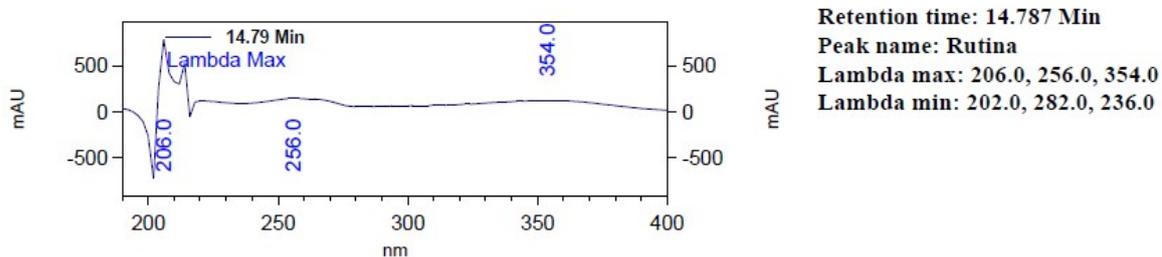


Figura 24. Espectro de absorção ultravioleta de rutina na solução amostra do extrato seco de *E. suberosum*

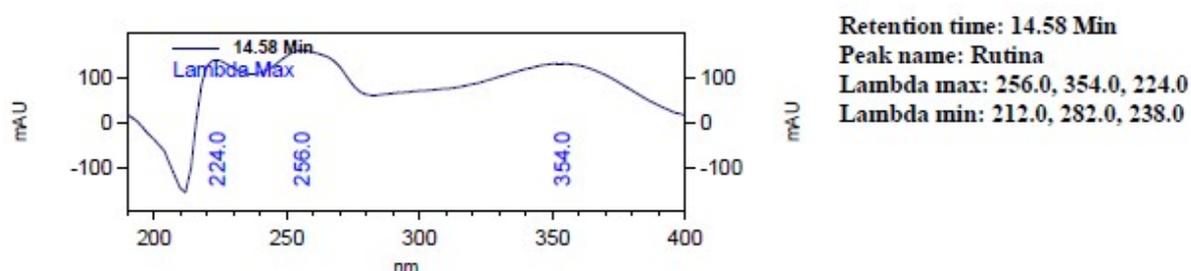


Figura 25. Espectro de absorção ultravioleta do Pico 1 da solução amostra do extrato seco de *E. suberosum*

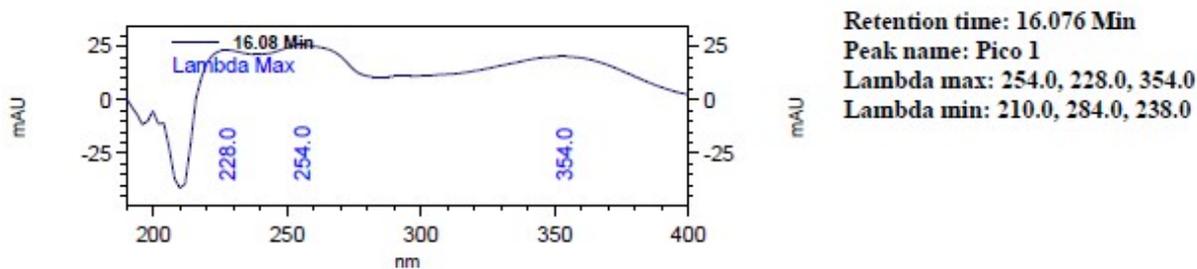
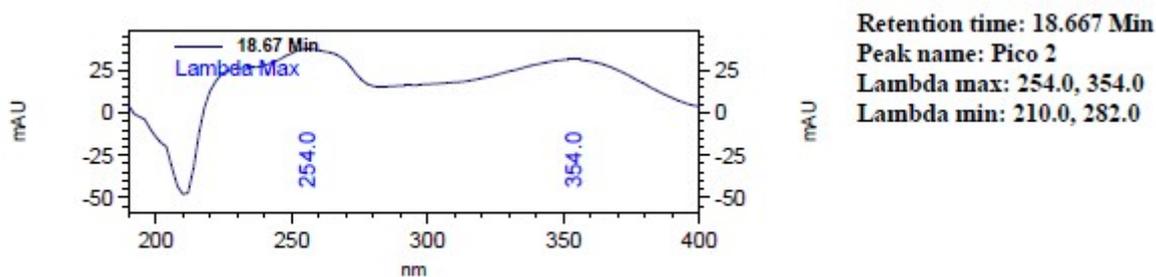


Figura 26. Espectro de absorção ultravioleta do Pico 2 da solução amostra do extrato seco de *E. suberosum*



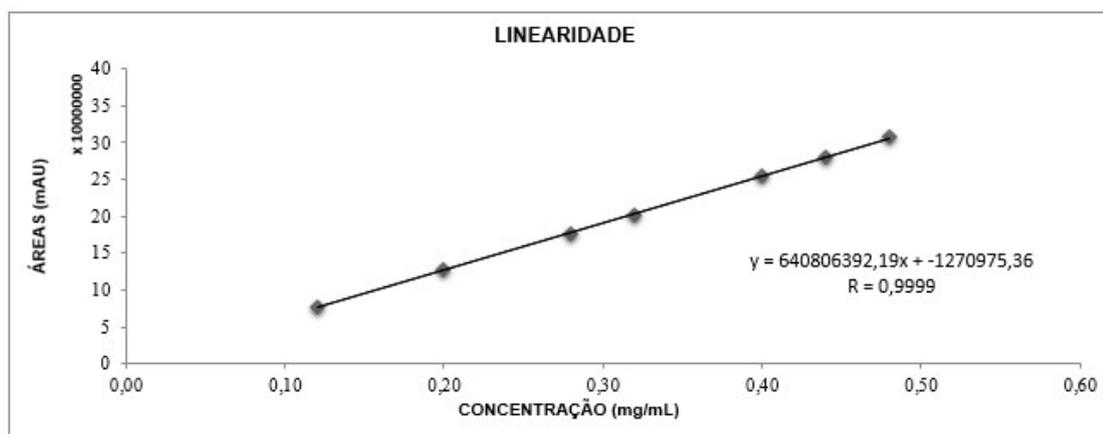
6.4.3 Linearidade

É a capacidade do método em gerar respostas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa determinada pelo intervalo da curva de calibração.

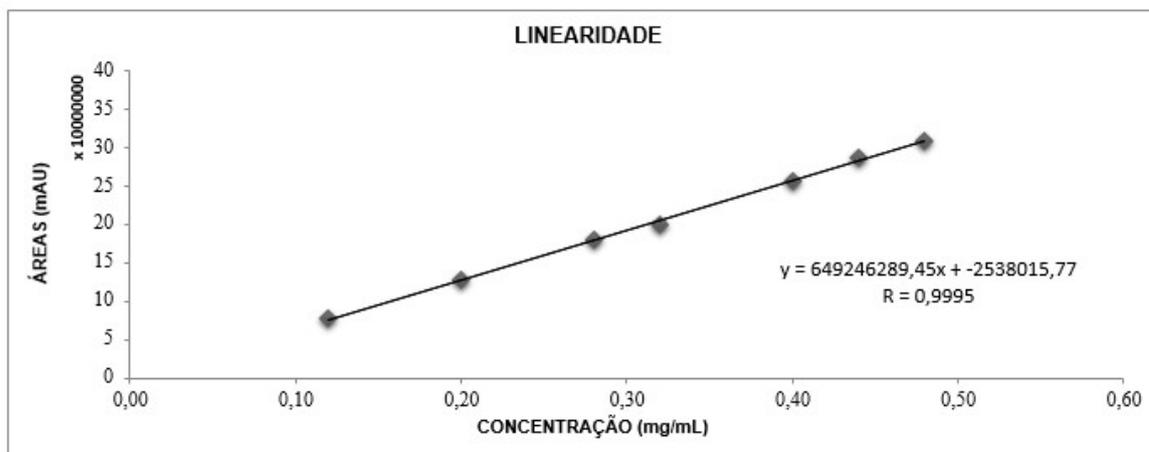
A linearidade foi determinada mediante a análise do coeficiente de correlação linear (r), obtido por três curvas de calibração preparadas em dias diferentes. A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações de rotina presente nas soluções com coeficiente de correlação médio (r) igual a 0,9999 para a curva 1; 0,9995 para a curva 2 e 0,9998 para a curva 3. Estas correlações foram verificadas na faixa de concentração de 0,12mg/mL a 0,48mg/mL, utilizando-se sete concentrações para a construção das três curvas. Os dados referentes às curvas padrões são apresentados nas Tabelas 12 à 14 e as equações da reta obtidas para as curvas de calibração são apresentadas nas **Figuras 27 à 29**.

Tabela 12. Áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - 1º dia

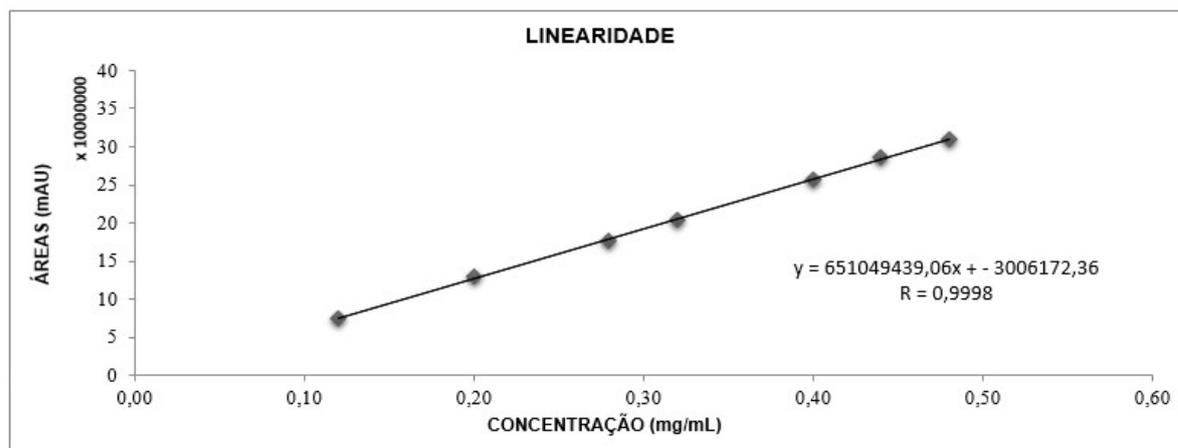
CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	ÁREAS (mAU)	MÉDIA (mAU)	DESV PAD	DPR
	76087928			
0.12	76940040	76351376	510733	0.67
	76026159			
	127708909			
0.20	127747236	127534979	334996	0.26
	127148792			
	177289469			
0.28	177975464	177700272	362546	0.20
	177835882			
	202363643			
0.32	202284839	202313295	43726	0.02
	202291402			
	254902626			
0.40	254573986	254809034	204960	0.08
	254950491			
	281112716			
0.44	281472059	281291971	179673	0.06
	281291139			
	307044200			
0.48	307081857	306875755	324913	0.11
	306501209			

Figura 27. Curva de calibração do padrão de rotina – 1º dia**Tabela 13.** Áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - 2º dia

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	ÁREAS (mAU)	MÉDIA (mAU)	DESV PAD	DPR
	77532984			
0.12	77020569	76640689	1131134	1.48
	75368514			
	126874591			
0.20	125741259	125867887	949742	0.75
	124987812			
	179257844			
0.28	178124593	178093396	1180355	0.66
	176897752			
	200369875			
0.32	201118942	201759423	1797508	0.89
	203789451			
	256789235			
0.40	253897522	255187430	1470871	0.58
	254875532			
	286845628			
0.44	282597456	282799835	3948495	1.40
	278956421			
	308875421			
0.48	306897562	307676657	1053600	0.34
	307256987			

Figura 28. Curva de calibração do padrão de rotina – 2º dia**Tabela 14.** Áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - 3º dia

CONCENTRAÇÕES (mg/mL)	ÁREAS (mAU)	MÉDIA (mAU)	DESV PAD	DPR
	75026985			
0.12	74559873	75494162	1235972	1.64
	76895627			
	129254873			
0.20	128145511	128429983	725747	0.57
	127889566			
	176985561			
0.28	179895622	178444727	1455048	0.82
	178452999			
	204562314			
0.32	202412587	203501591	1075143	0.53
	203529872			
	256987154			
0.40	255871369	255365015	1925903	0.75
	253236523			
	285365239			
0.44	282568514	283804103	1426500	0.50
	283478555			
	309125411			
0.48	306487555	307819392	1319118	0.43
	307845211			

Figura 29. Curva de calibração do padrão de rutina – 3º dia

6.4.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação, determinado experimentalmente para o ativo rutina, foi o nível de concentração igual à 0,002mg/mL com sinal ruído calculado de 11,3 (Tabela 15). Foram preparadas 6 amostras na concentração do limite de quantificação e avaliado o desvio padrão entre os resultados (Tabela 16), sendo aprovado com $DPR \leq 5\%$, conforme especificação da ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 15. Resultado da relação sinal ruído do ativo rutina

Concentração (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Sinal Ruído
0,04	26447920	134,6
0,02	13459051	114,7
0,008	5373264	40,6
0,004	2594651	20,3
0,002	1304519	11,3
0,0008	358901	3,2
0,0004	Não detectado	-

Tabela 16. Resultado das preparações do sinal ruído determinado do ativo rutina

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1		127122325	100,00
Padrão 2	0,20	126852140	100,00
Padrão 3		126982369	100,00
Média:		126985611	-
Desvio Padrão (DP):		135122	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,11 %	-
Injeções	Concentração (mg/mL)	Área de Rutina (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1	0,002	1304125	0,0021
Amostra 2	0,002	1299852	0,0020
Amostra 3	0,002	1309625	0,0021
Amostra 4	0,002	1301120	0,0020
Amostra 5	0,002	1297545	0,0020
Amostra 6	0,002	1307911	0,0021
Média:			0,002
Desvio Padrão (DP):			0,000
Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,36 %

6.4.4 Precisão – extrato bruto de *E. suberosum*

Os ensaios realizados para análise de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram desvio padrão relativos de 0,90% e 1,31%, respectivamente (Tabelas 17 e 18). Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o desvio padrão relativo entre os resultados das replicatas realizadas foram $\leq 5\%$, conforme especificação da ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 17. Precisão 1° dia

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1	0,20	128016673	100,00
Padrão 2		127016673	100,00
Padrão 3		127016673	100,00
Média:		127350006	-
Desvio Padrão (DP):		577350	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,45 %	-

Injeções	Concentração do Extrato Bruto (mg/mL)	Área de Rutina na Amostra (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1	5,0	120129472	0,189
Amostra 2	5,0	123113323	0,193
Amostra 3	5,0	122608015	0,193
Amostra 4	5,0	122661696	0,193
Amostra 5	5,0	122486479	0,192
Amostra 6	5,0	121471400	0,191
Média:			0,192
Desvio Padrão (DP):			0,002
Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,90 %

Tabela 18. Precisão Intermediária

Injeções	Precisão 1° Dia			Precisão 2° Dia			
	Conc. do padrão de Rutina (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (%)	Conc. do padrão de Rutina (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (%)	
Padrão 1	0,20	128016673	100,00	0,20	127021322	100,00	
Padrão 2		127016673	100,00		126021577	100,00	
Padrão 3		127016673	100,00		128745192	100,00	
Média:		127350006	-	Média:		127262697	-
Desvio Padrão:		577350	-	Desvio Padrão:		1377758	-
DPR:		0,45 %	-	DPR:		1,08 %	-

Injeções	Precisão 1° Dia			Precisão 2° Dia			
	Conc. do Extrato Bruto (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (mg/mL)	Conc. do Extrato Bruto (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (mg/mL)	
Amostra 1	5,0	120129472	0,189	5,0	118068867	0,186	
Amostra 2	5,0	123113323	0,193	5,0	121477931	0,191	
Amostra 3	5,0	122608015	0,193	5,0	121262821	0,191	
Amostra 4	5,0	122661696	0,193	5,0	121766910	0,191	
Amostra 5	5,0	122486479	0,192	5,0	121706149	0,191	
Amostra 6	5,0	121471400	0,191	5,0	119098648	0,187	
Média:			0,192	Média:			0,189
Desvio Padrão (DP):			0,0017 %	Desvio Padrão (DP):			0,0025 %
Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,90 %	Desvio Padrão Relativo (DPR):			1,31 %

6.4.5 Precisão – extrato seco de *E.suberosum*

Os ensaios realizados para análise de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram desvio padrão relativos de 0,24% e 0,51%, respectivamente (Tabelas 19 e 20). Os resultados estão em conformidade com a especificação de $\leq 5\%$, ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 19. Precisão 1° dia

Injeções	Concentração do Padrão de Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Resultados (%)
Padrão 1	0,40	254158665	100,00
Padrão 2		254843903	100,00
Padrão 3		256281593	100,00
Média:		255094720	-
Desvio Padrão (DP):		1083461	-
Desvio Padrão Relativo (DPR):		0,42 %	-
Injeções	Concentração do Extrato Seco (mg/mL)	Área de Rutina na Amostra (mAU)	Resultados (mg/mL)
Amostra 1	5,0	252546334	0,396
Amostra 2	5,0	253299545	0,397
Amostra 3	5,0	252412671	0,396
Amostra 4	5,0	253023880	0,397
Amostra 5	5,0	253369253	0,397
Amostra 6	5,0	254046281	0,398
Média:			0,397
Desvio Padrão (DP):			0,001
Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,24 %

Tabela 20. Precisão Intermediária

Injeções	Precisão 1° Dia			Precisão 2° Dia			
	Conc. do padrão de Rutina (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (%)	Conc. do padrão de Rutina (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (%)	
Padrão 1	0,40	254158665	100,00	0,20	255214632	100,00	
Padrão 2		254843903	100,00		254238741	100,00	
Padrão 3		256281593	100,00		253235147	100,00	
Média:		255094720	-	Média:		254229507	-
Desvio Padrão:		1083461	-	Desvio Padrão:		989775	-
DPR:		0,42 %	-	DPR:		0,39 %	-
Injeções	Precisão 1° Dia			Precisão 2° Dia			
	Conc. do Extrato Seco (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (mg/mL)	Conc. do Extrato Seco (mg/mL)	Área (mAU)	Resultados (mg/mL)	
Amostra 1	5,0	252546334	0,396	5,0	251236478	0,395	
Amostra 2	5,0	253299545	0,397	5,0	252589654	0,397	
Amostra 3	5,0	252412671	0,396	5,0	253478125	0,399	
Amostra 4	5,0	253023880	0,397	5,0	253110225	0,398	
Amostra 5	5,0	253369253	0,397	5,0	251362541	0,395	
Amostra 6	5,0	254046281	0,398	5,0	250123547	0,394	
Média:			0,397	Média:			0,396
Desvio Padrão (DP):			0,0009 %	Desvio Padrão (DP):			0,0020 %
Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,24 %	Desvio Padrão Relativo (DPR):			0,51 %

6.4.6 Exatidão - extrato bruto de *E. suberosum*

O teste de exatidão obteve recuperação de 101,76% para o nível de concentração de 0,04mg/mL; 99,61% para o nível de 0,1mg/mL e 100,82% para o nível de 0,14mg/mL demonstrando que a matriz (extrato bruto de *E. Suberosum*) não interferiu na recuperação do ativo rutina adicionado, sendo o cálculo de recuperação conforme **Equação 3** e **Equação 4** e os resultados apresentados na Tabela 21.

Equação 3, onde:

R_{EB_F} = Área da amostra fortificada, matriz do extrato bruto com adição do padrão de rutina, em mAU;

$R_{EB_50\%}$ = Área de rutina do extrato bruto de *E. suberosum* (50%), em mAU;

R_{PD} = Área do pico de rutina obtida a partir da solução padrão de rutina, em mAU.

$$\text{Teor de rutina adicionada (\%)} = ((R_{EB_F} - R_{EB_50\%}) / R_{PD}) \times 100$$

Equação 4, onde:

$T_{rutina_adicionada}$ = Concentração de rutina adicionada, em mg/mL;

$T_{teórico_rutina_adicionada}$ = Concentração teórica de rutina adicionada, em mg/mL.

$$\text{Exatidão (\%)} = (T_{rutina_adicionada} / T_{teórico_rutina_adicionada}) \times 100$$

Tabela 21. Resultados de recuperação para o teste de exatidão do extrato bruto de *E. suberosum*

Injeções	Conc. Padrão Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Concentração (%)				
Padrão 1		127702398	100,00				
Padrão 2	0,2	128016673	100,00				
Padrão 3		126228581	100,00				
		Média: 127315884	-				
		Desvio Padrão (DP): 954653,37	-				
		DPR (%): 0,75	-				
Concentração da Amostra de Extrato Bruto (mg/mL)		Área de Rutina do Extrato Bruto (50%)					
2,5		63244831					
Concentração Teórica de Rutina Adicionada (mg/mL)	Injeções	Área Amostra Fortificada (mAU)	Concentração de Rutina Adicionada (mg/mL)	DP	DPR (%)	Recuperação (%)	Média Recuperação (%)
0,04	Amostra 1	89094080	0,041	0,0001	0,22	101,52	101,76
	Amostra 2	89207159	0,041			101,96	
	Amostra 3	89165259	0,041			101,80	
0,10	Amostra 1	126502134	0,099	0,0009	0,93	99,37	99,61
	Amostra 2	126152436	0,099			98,82	
	Amostra 3	127305685	0,101			100,63	
0,14	Amostra 1	153253457	0,141	0,0009	0,64	101,00	100,82
	Amostra 2	152453829	0,140			100,10	
	Amostra 3	153574590	0,142			101,36	

6.4.7 Exatidão - extrato seco de *E.suberosum*

O teste de exatidão obteve recuperação de 99,07% para o nível de concentração de 0,08mg/mL; 100,48% para o nível de 0,2mg/mL e 101,04% para o nível de 0,28mg/mL, demonstrando que a matriz (extrato seco de *E. Suberosum*) não interferiu na recuperação do ativo rutina adicionado, sendo o cálculo de recuperação conforme **Equação 3** e **Equação 4**, apresentados no teste de exatidão do extrato bruto de *E. Suberosum*, e os resultados apresentados no Tabela 22.

Tabela 22. Resultados de recuperação para o teste de exatidão do extrato seco de *E. suberosum*

Injeções	Conc. Padrão Rutina (mg/mL)	Área do Padrão de Rutina (mAU)	Concentração (%)				
Padrão 1	0.4	255632145	100.00				
Padrão 2		254857491	100.00				
Padrão 3		255110236	100.00				
		Média:	255199957	-			
		Desvio Padrão (DP):	395043.85	-			
		DPR (%):	0.15	-			
Concentração da Amostra de Extrato Bruto (mg/mL)		Área de Rutina do Extrato Seco (50%)					
2.5		126043953					
Concentração Teórica de Rutina Adicionada (mg/mL)	Injeções	Área Amostra Fortificada (mAU)	Concentração de Rutina Adicionada (mg/mL)	DP	DPR (%)	Recuperação (%)	Média Recuperação (%)
0.08	Amostra 1	176843503	0.080	0.0003	0.42	99.53	99.07
	Amostra 2	176556437	0.079			98.97	
	Amostra 3	176431905	0.079			98.72	
0.20	Amostra 1	255386088	0.203	0.0018	0.90	101.37	100.48
	Amostra 2	254304620	0.201			100.52	
	Amostra 3	253076469	0.199			99.56	
0.28	Amostra 1	307044200	0.284	0.0020	0.71	101.32	101.04
	Amostra 2	305081857	0.281			100.22	
	Amostra 3	307501209	0.284			101.58	

6.4.8 Robustez - extrato bruto de *E.suberosum*

O teste de robustez obteve resultados de teor com Desvio Padrão Relativo (DPR) $\leq 2,0$ em todas as alterações de parâmetros cromatográficos propostas: fluxo de fase móvel, temperatura e lote da coluna cromatográfica, na validação do extrato bruto de *E.suberosum*, demonstrando que o método é robusto dentro destas variações. Resultados conforme Tabela 23.

Tabela 23. Resultados de teor para o teste de robustez para o extrato bruto de *E.suberosum*

Fluxo de Fase Móvel	1,4mL/min	1,5mL/min	1,6mL/min	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
Resultado (mg/mL)	0,190	0,192	0,196	0,0031	1,586
Temperatura	38°C	40°C	42°C	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
Resultado (mg/mL)	0,195	0,192	0,191	0,0021	1,080
Lote Coluna Cromatográfica	Lote A	Lote B	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)	
Resultado (mg/mL)	0,192	0,194	0,0014	0,733	

6.4.9 Robustez - extrato seco de *E.suberosum*

O teste de robustez obteve resultados de teor com Desvio Padrão Relativo (DPR) $\leq 2,0$ em todas as alterações de parâmetros cromatográficos propostas: fluxo de fase móvel, temperatura e lote da coluna cromatográfica, na validação do extrato seco de *E. suberosum*, demonstrando que o método é robusto dentro das variações propostas. Resultados conforme Tabela 24.

Tabela 24. Resultados de teor para o teste de robustez para o extrato seco de *E.suberosum*

Fluxo de Fase Móvel	1,4mL/min	1,5mL/min	1,6mL/min	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
Resultado (mg/mL)	0.397	0.401	0.396	0.0026	0.665
Temperatura	38°C	40°C	42°C	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)
Resultado (mg/mL)	0.405	0.396	0.399	0.0046	1.146
Lote Coluna Cromatográfica	Lote A	Lote B	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR)	
Resultado (mg/mL)	0.406	0.396	0.0071	1.763	

6.5 Análise do extrato seco encapsulado

O teor de rutina encontrado foi decrescente com a adição do adjuvante de secagem maltodextrina, comparada com a amostra controle onde não houve adição do adjuvante (Tabela 25).

Tabela 25. Resultados do teor de rutina no extrato seco de *E. suberosum*

Massa Maltodextrina / Volume Extrato Bruto (100mL)	Massa de Extrato Seco produzido em gramas (g)	Teor de Rutina (mg/mL)
Controle	0,522	0,395
0,32%	0,590	0,376
0,64%	0,609	0,352
1,60%	0,642	0,347
3,20%	0,706	0,314
4,80%	0,788	0,272

6.6 Análise de fotoestabilidade do extrato seco encapsulado

A partir dos resultados (Tabela 26) do teor de rutina determinado na amostra controle e nas amostras iniciais (0,32%; 0,64%; 1,60%; 3,20% e 4,80%) em relação ao teor obtido após exposição para cada nível, verificou-se que não houve queda significativa nos teores de rutina. Portanto pode-se considerar o marcador rutina estável em exposição à luz e o extrato seco de *E. suberosum* um potencial produto para desenvolvimento farmacotécnico.

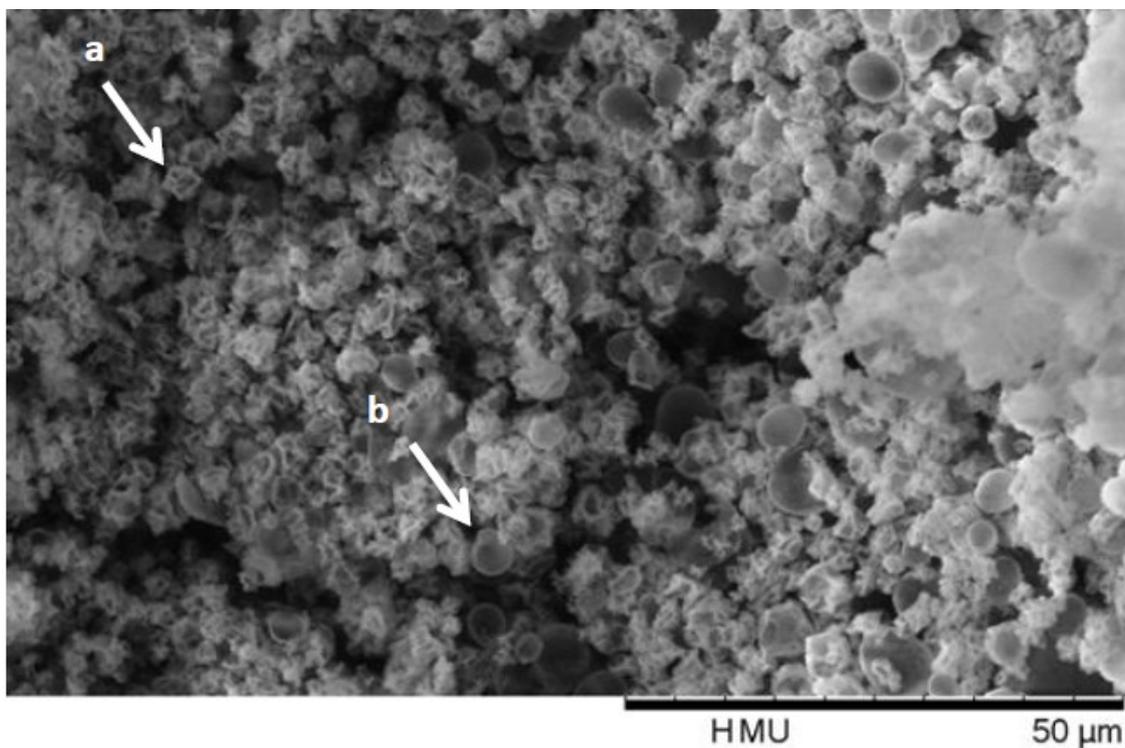
Tabela 26. Resultados de fotoestabilidade do extrato seco de *E. suberosum*

Amostra extrato seco	Teor de Rutina Inicial (mg/mL)	Teor de Rutina após exposição(mg/mL)
Controle	0,395	0,393
0,32%	0,376	0,377
0,64%	0,352	0,350
1,60%	0,347	0,348
3,20%	0,314	0,312
4,80%	0,272	0,273

6.7 Caracterização das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura

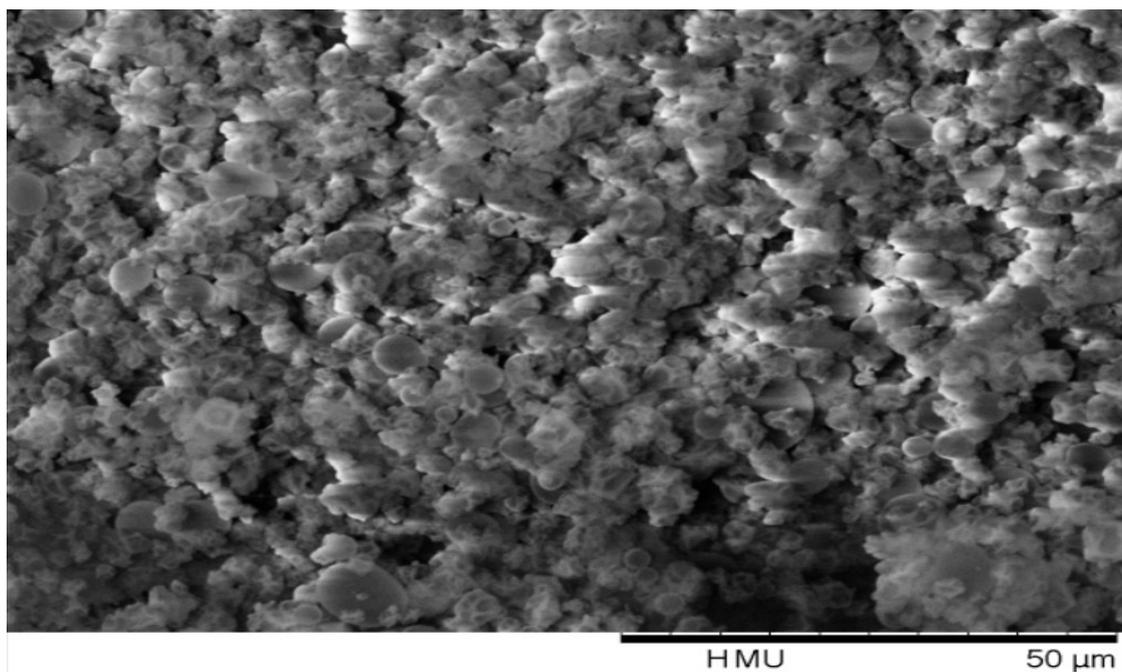
Amostras de micropartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 30. Imagem das partículas de *E. suberosum* em extrato seco (atomizado).



Legenda: Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de 1500 vezes. a- partículas com parede rugosa; b- partículas com parede lisa.

Figura 31. Imagem das partículas de *E. suberosum* em extrato seco encapsulado com 4,8 % de maltodextrina.



Legenda: Fotomicrografia obtida por MEV em aumento de 1500 vezes.

De um modo geral, as microcápsulas apresentaram formato esférico, característico das partículas produzidas pelo processo de *spray drying*. As superfícies das microcápsulas foram predominantemente rugosas, embora algumas tenham apresentado superfície completamente lisa. Segundo THIES (1995), as depressões que aparecem na superfície das microcápsulas são formadas devido à contração das partículas durante a secagem e o resfriamento. A extensão das depressões observadas em microcápsulas produzidas por *spray drying* ocorre em função do agente utilizado, sendo significativa naquelas que possuem cobertura de polissacarídeos (TONON et al., 2009). Nas amostras do extrato seco e do extrato encapsulados foram observadas a formação de partículas esféricas com parede rugosa e lisa. Quanto maior a incidência de partículas de parede lisa melhor torna-se o escoamento do material favorecendo a extrusão do *spray dryer*.

Contudo, o aumento da temperatura pode resultar em um maior número de partículas com superfície lisa, devido às taxas de secagem mais altas. De acordo com Reineccius (2001), os processos realizados em condições de maiores taxas de secagem (maiores temperaturas) produzem partículas maiores que aqueles realizados com menores taxas, já que a secagem mais rápida promove a formação mais imediata da estrutura, evitando, assim, que as partículas encolham durante a secagem. Quando a temperatura do ar de secagem é baixa, a partícula fica mais encolhida e, dessa forma, com diâmetro menor.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Foi realizada a identificação da espécie *E. suberosum* A. St. Hil;
- ✓ Dentre os parâmetros farmacognósticos estabelecidos foram realizados os testes de caracterização do material vegetal: análise microscópica dos pós; pesquisa de material estranho; determinação do teor de cinzas; análise granulométrica; determinação da perda por dessecação; determinação do perfil cromatográfico de *E. suberosum* por cromatografia em Camada Delgada (CCD) e determinação do teor de rutina. Tais análises são importantes para nortear o controle de qualidade da droga vegetal caso esta se torne matéria

prima para a produção de fitoterápicos, uma vez que a espécie possui metabólitos secundários de interesse para a terapêutica;

- ✓ Foram obtidos 217,98g de extrato bruto etanólico com rendimento de 22,4%, portanto, um rendimento superior aos estudos anteriores realizados por Alves (2010) e Reis (2015) com extrato aquoso e etanólico. Sugerindo que estudos sobre métodos de extração, bem como as condições de extração especialmente o solvente e temperatura utilizados, devem ser explorados.
- ✓ A validação da metodologia analítica de quantificação de rutina no extrato bruto e extrato seco por CLAE-DAD, cujos testes de seletividade; linearidade; Limite de quantificação; precisão; exatidão e robustez foram realizados, demonstrando que o método escolhido se mostrou eficiente para a quantificação do marcador rutina;
- ✓ Os resultados obtidos pelos testes do extrato seco encapsulado por atomização em 6 concentrações de adjuvante de secagem maltodextrina (0,32%; 0,64%; 1,60%; 3,20% e 4,80%) demonstram eficiência na formação de partículas que favorecem a manutenção do fluxo de escoamento do derivado encapsulado. Contudo, sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a proteção do marcador rutina no derivado encapsulado.
- ✓ O teste de fotoestabilidade do extrato seco demonstrou a estabilidade do extrato seco bem como da rutina em exposição à luz, o que torna ambos interessantes sob o ponto de vista farmacotécnico.
- ✓ A caracterização do extrato encapsulado apresenta-se como uma ferramenta qualitativa para o estudo parcial da eficácia da maltodextrina como agente encapsulante. Assim, podem ser promissores os estudos de atomização com variação das condições de temperatura, fluxo e quantidade de maltodextrina.
- ✓ Os estudos realizados contribuem para o arcabouço de informações a cerca de *E. suberosum*, uma espécie de importante família botânica (Erytroxylaceae), mas abre horizontes para futuros estudos farmacotécnicos e biológicos com os derivados vegetais de *E. suberosum* ou com demais espécies do bioma Cerrado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMD, A.; KALEEM, M.; AHMED, Z.; SHAFIQ, H. Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action against Microbial and Viral Infections - A Review. **Food Research International**, v.77, n.2, p.221-235, 2015.

ANDERSEN, Ø. M.; MARCKHAM, K. R. **FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton-FL, CRC Press LLC, 2006.

ANSEL, S.M.; PEGEL, K.H.; TAYLOR, D.A.H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v.32, n.4, p.953-959, 1993.

ANSEL, H. C.; POPOVIC, N. C.; JR. ALLEN, L. V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 6th edition, Williams & Wilkins, p.216, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº 45 de 09/08/2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.

ARAÚJO, T. F.; FIASHI, P.; AMORIM, A. M. *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) na Mata Atlântica da Bahia, Brasil, **Rodriguésia**, v.65, n.3, p.637-658, 2014.

AZINOVA, S. S.; VINOGRADOVA, V. I. **Natural Compound – Flavonoids: Plant Sources, Structure and Properties**. New York – USA, Science + Business Media, 2013.

BACCHI, Elfriede Marianne. Alcalóides Tropânicos. In SIMÕES, M.O. et al. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 793-817, 2004.

BANDEIRA, H. F. S.; SEABRA, S. S. S.; STRUCKER, A.; LIMA, A. C. S.; NASCIMENTO, F.C Avaliação da atividade inseticida de extratos de *Erythroxylum suberosum* no controle do pulgão-preto (*Aphis craccivora*). In: **Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia 2012**, Curitiba-PR, 2012. Disponível em: <http://seb.web2130.uni5.net/asp/cbe2012/trabalhos/707/707_2.pdf>. Acesso em junho de 2016.

BARBOSA, A. V. G.; AMARAL JR. A. **Flora dos estados de Goiás e Tocantins: Erythroxylaceae**. Editora da UFG. Goiânia. 2001. 73p.

BARBOSA, W. L. R., ZINTO, L. D. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl, p.47-49, 2003.

BAKAN, J. A. Microencapsulation In: LACKMAN, L. LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3rd edition, Philadelphia, Lea & Febiger, vol. II, p. 412-428, 1986.

BLOOR, S. J. **Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids**, p. 3-14 In: PACKER, L. Flavonoids and other polyphenols: Methods in enzymology, V. 335, Cambridge, MA: Academica Press, 2001.

BOHM, B. A.; LOO, T; NICHOLLS, K. W.; PLOWMAN, T. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. **Phytochemistry**, v.27, n.3, p.833-837, 1988.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**. R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003.

BUCKINGHAM, J.; MUNASINGHE, V. R. N. **Dictionary of Flavonoids**. Boca Raton-FL, CRC Press LLC, 2015.

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.319-314, 2008.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, v.138, n.4, p.2099-2107, 2013.

CHUA, L. S. **A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities**. Journal of Ethnopharmacology, v.150, n.3, p.805-817, 2013.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Oxford-UK, Blackwell, 2006.

COSTA, A. R. T. **Aplicação do ensaio de dissolução na avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos à base de Passiflora sp**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; SILVA JR, J. O. C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.3, p.169-174, 2009.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v.16, n.9-10, p.71-76, 2004.

DEWICK, P. M. Medicinal **Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3 ed. New York: John Wiley, 2009.

EVANS, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, n.2-3, p.265–277, 1981.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; CIONI, P. L.; CECCARINI, L.; RICCI, A. S.; LONGO, I. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. **Journal of Chromatography**, v.1143, n.1, p.36-40, 2007.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, in press.

GARCEZ, F. R.; NASCIMENTO, C.; GARCEZ, W. S.; VIOLANTE, I. M. P.; POTT, A. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v.5, n.2, p.401-406, 2012.

GARCÍA, J.; RIEGER-REYES, C.; SAZ-PEIRO, P. Efecto de los flavonoides en la prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. **Medicina Clinica**, v.139, n.8, p.358-363, 2012.

GIL, E. S.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.3, p.542-558, 2013.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PINO-RODRIGUEZ, S.; GARCIA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEX, M. T.; ECHEMENDIA-ARANA, O. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Phytochemical screening and in vitro antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.23, n.4, p.506-509, 2004.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.26, n.4, p.809-812, 1978.

HOENSCH, H. P.; OERTEL, R. The value offlavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. **Clinical Nutrition Experimental**, v.3, p.8-14, 2015.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

LEITE, C. F. M.; LEITE, B. H. M.; BARROS, CARVALHO, I. M.; GOMES, S. M.; FAGG, C. W.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M. Determination of

rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.13, n.2, p.135-143, 2014.

LI, X-J.; WANG, W.; LUO, M; LI, C-Y.; ZU, Y-G.; MU, P-S.; FU, Y-J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.133, n.2, p.437-444, 2012.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Florada Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botânica Brasília**, v.21, n.2, p.473-487, 2007.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v.1043, n.2, p.323 - 327, 2004.

MACEDO, T. B. C.; ELIAS, S. T.; TORRES, H. M.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; GUERRA, E. N. S.; SILVA, M. A. G. Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.1, p.108-112, 2016.

MAGDASSI, S. **Delivery Systems in Cosmetics. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 123-124: 671-679, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

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

MENDEZ, A.S.L.; SIMIONATO, N.O.; VALDUGA, A.T.; REGINATTO, F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.105-111, 2011.

MENDONÇA, J. O.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. O gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.41, n.3, p.349-358, 1998.

MORAIS, N. A. **Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MU, L.; FENG, F.F. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol®) loaded poly (latic-co-glycolic acid) microspheres prepared by *spray drying* technique with lipid / cholesterol emulsifiers. **Journal of Controlled Released**, v.76, n.3, p.239-254, 2001.

NASCIMENTO, M. N. G. **Estudo químico de *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V.** 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão), Catalão, 2014.

NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v.5, n.2, p.401-406, 2012.

NAKAMURA, A.T. **Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de *Erythroxylum P. Browne* (Erythroxylaceae).** 2003. 72f. Dissertação - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

OLIVEIRA, F. F. S.; AGUIAR, P. N. C.; RIBEIRO, G. J. G.; AMORIM, M. L. L.; GUIMARÃES, P. S. S.; MENDONÇA FILHO, C. V.; SIVIERI, R. R. G.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, W. T. P.; GRAEL, C. F. F. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Extracts of *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil (Erythroxylaceae). **Research Journal of Phytochemistry**, v.9, n.2, p.68-78, 2015.

OLIVEIRA, V. M.; CARRARO, E.; AULER, M. E.; KHALIL, N. M. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Biology**, in press.

PLOWMAN, T., HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia** 56: 1–53, 2004.

QUEIROZ, E. F. **Composição farmacêutica, produto farmacêutico, processos de obtenção de compostos farmacêuticos e uso de tais compostos para o tratamento de disfunção erétil.** Patente nº PI 0705772-5A. República Federativa do Brasil, 2008.

RAUL, A.; UDDIN, G.; SIDDIQUI, B. S.; KHAN, H. SHAH, S. U. A. ; HADDA, T. B.; MABKHOT, Y. N.; FARROQ, U.; KHAN, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. **Complementary Therapies in Medicine**, v.25, p.132-138, 2016.

REINECCIUS, G. A. Multiple-core encapsulation: the spray drying of food ingredients. In: VILSTRUP, P. **Microencapsulation of food ingredients.** Surrey: Leatherhead Publishing. cap. 9, p. 151-185. 2001.

RODRIGUES, G. A.; SOUZA, W. ; FERREIRA, H. D.; VILA VERDE, G.M. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St. Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas em Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1159-1168, 2015.

ROLIM A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. **Jounal Aoac International**, v.88, n.4, p.1015-19, 2005.

SILVA, J. B.; SALATINO, A.; PANIZZA, S. Ensaio fitoquímicos preliminares em espécies do cerrado. **Bol. Botânica**, v.4, p.129-142, 1976.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, supl., p.671-677, 2006.

SOMAVILLA, N. S. **Utilização de plantas medicinais por uma comunidade garimpeira do sudoeste mato-grossense**. 1998. 104p. Dissertação - Instituto de Saúde Coletiva – UFMT, Cuiabá, Brasil, 1998.

SPENCER, J. P. E.; CROZIER, A. **Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function**. Boca Raton-FL, CRC Press LLC, 2015.

THIES, C. **How to make microcapsules**. St Louis, Missouri: Lecture and Laboratory, 1995.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by *spray drying* and fluidized bed agglomeration. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, n.1, p.29-35, 2005.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, 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.

VILA VERDE, G.M. **Otimização do processo de extração e controle de qualidade de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais do Cerrado, *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) e *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)**. Relatório Final de Bolsa Auxílio Pós-Doc apresentado à Fapeg. Goiânia. 2014.19p

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTTI, V.J. ; GARCEZ, F. R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.4, p.1302-1308, 2012.

WINK, M. **ANNUAL PLANT REVIEWS, V. 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites**, 2ª ed., Oxford-UK, Blackwell, 2010.