



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Avaliação do perfil químico, variações sazonais e
estudo de controle de qualidade de espécies do gênero
Monteverdia: *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral e
Monteverdia rigida (Mart) Biral**

JOÃO PESSOA – PB

2021

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Avaliação do perfil químico, variações sazonais e
estudo de controle de qualidade de espécies do gênero
Monteverdia: *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral e
Monteverdia rigida (Mart) Biral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, em cumprimento às exigências para a
obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos, na área de Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

**JOÃO PESSOA – PB
2021**

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

A663a Araújo, Diego Igor Alves Fernandes de.
Avaliação do perfil químico, variações sazonais e
estudo de controle de qualidade de espécies do gênero
Monteverdia : Monteverdia obtusifolia (Mart) Biral e
Monteverdia rigida (Mart) Biral / Diego Igor Alves
Fernandes de Araújo. - João Pessoa, 2021.
432 f.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Substâncias vegetais. 2. Monteverdia obtusifolia
Mart. 3. Monteverdia rigida Mart. 4. Controle de
qualidade. 5. Validação analítica. 6. Desreplicação. I.
Silva, Marcelo Sobral da. II. Título.

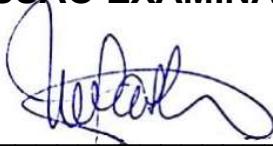
UFPB/BC

CDU 615.322(043)

DIEGO IGOR ALVES FERNANDES DE ARAÚJO

**Avaliação do perfil químico, variações sazonais e
estudo de controle de qualidade de espécies do gênero
Monteverdia: *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral e
Monteverdia rigida (Mart) Biral**

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Orientador



Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Examinador Interno – Titular



Profa. Dra. Luciana Scotti
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Examinador Interno – Titular

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
Universidade Federal da Paraíba – UFPB
Examinador Externo – Titular



Profa. Dra. Larissa Araújo Rolim
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF
Examinador Externo - Titular

*Dedico este trabalho à **Helena**,
por me motivar a cada dia para ser uma pessoa melhor;
À minha família, **Francisco, Jacinta, Priscylla e Anny Palloma**,
por todo amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, **Francisco Alves** e **Maria Jacinta**, por serem meus exemplos de amor, afeto e dedicação. Por terem acreditado em meus sonhos e me dado todo suporte e incentivo que precisei para que eu não desistisse diante dos obstáculos encontrados.

À minha irmã **Priscylla Rayama**, que sempre esteve presente em minha caminhada, mesmo à distância, por meio de suas palavras amigas e encorajadoras. Por me proporcionar o verdadeiro amor fraterno.

À minha esposa **Anny Palloma**, que acreditou nos meus sonhos, esteve ao meu lado e soube acalentar-me com palavras ternas. Por me ensinar a viver um dia de cada vez e acreditar em um mundo melhor. Pela sua paciência e compreensão em todos os momentos que me ausentei para a execução dos experimentos e escrita deste trabalho.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva**, pela confiança depositada, competência e hombridade. Por ser uma das minhas maiores referências acadêmicas. Meus sinceros agradecimentos pela orientação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**, pela oportunidade que me foi dada de fazer parte do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF-UFPB) e por me iniciar na vida científica.

Aos amigos da pós-graduação e companheiros de experimentos, **Anderson Vieira, Rodrigo Andrade e Kaio Aragão**, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, em especial **Roseana Ramos, Ana Rita, Natan Teles, Pedro Figueiredo, Joanda Paolla, Jordana Silva, George Santos e Thalisson Amorim** pelos bons momentos que passamos ao longo destes 4 anos.

Ao servidor **Gilmário**, o Gil motorista, que foi essencial para a realização desta pesquisa. Meu parceiro de expedições botânicas.

Ao professor **Marcus T. Scotti** do programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela atenção e suporte científico nas análises multivariadas.

Muito Obrigado!

RESUMO

Os produtos naturais apresentam-se como uma rica fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos medicamentos, entretanto, a manutenção da qualidade de materiais de origem vegetal apresenta problemas ligados à insuficiência de dados fitoquímicos e especificações. As espécies *Monteverdia obtusifolia* Mart e *Monteverdia rigida* Mart são conhecidas popularmente como “bom-nome” sendo utilizadas na medicina popular para o tratamento de gastrites e úlceras. Estudos fitoquímicos relataram a presença de triterpenos, flavonoides e alcaloides em suas composições químicas. Todavia não existem estudos de controle de qualidade relatados para as espécies. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram realizar o controle de qualidade dos materiais vegetais, validar metodologias analíticas para quantificação de compostos fenólicos nos extratos etanólicos obtidos das espécies e verificar as variações sazonais na composição química de *M. obtusifolia*. Foram avaliados parâmetros otimizados para extração dos marcadores, determinação de água em drogas vegetais, cinzas totais e sulfatadas, análise granulométrica de pós, ensaio limite de metais pesados, densidade aparente de sólidos e contaminação microbiológica de acordo com as metodologias da Farmacopeia Brasileira 6^a edição. As quantificações dos flavonoides (FT) e compostos fenólicos totais (CFT) foram realizadas por método espectrofotométrico validado, utilizando a quercetina e ácido gálico como padrões. As composições químicas das espécies foram avaliadas por desreplicação dos extratos obtidos e as variações sazonais foram verificadas por uso de análises multivariadas (PCA/HCA). Os extratos etanólicos brutos obtidos das folhas de *M. obtusifolia* (EEBMO) e das folhas (F), caule (C), cascas da raiz (CR) e raízes (R) de *M. rigida* foram produzidos com partículas contendo $> 600 \mu\text{m}$ e $< 1200 \mu\text{m}$ de tamanho e submetidos à agitação, após otimização das condições de extração. O método analítico por (CLAE-DAD) para quantificação dos marcadores (-)-Epigallocatequina (EPG), (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI) foi validado e apresentou conformidade para todos os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 166/2017. Foi possível constatar que as espécies apresentaram riqueza de compostos fenólicos, flavonoides e flavan-3-óis, com maior prevalência para os meses de outubro e novembro na espécie *M. obtusifolia*, bem como no extrato oriundo das folhas de *M. rigida*. O *quenching* utilizado em *M. obtusifolia* não promoveu diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) para os marcadores (EPG, CAT e EPI) frente à secagem em estufa. A análise de (PCA) confirmou a correlação positiva entre a radiação solar e temperatura, além do efeito negativo da pluviometria e umidade sobre a produção dos marcadores avaliados (EPG, CAT, EPI, FT e CFT). O agrupamento realizado pela ferramenta de HCA confirmou os dados observados no PCA com reunião das amostras semelhantes. A desreplicação possibilitou a anotação putativa de 25 fenólicos no (EEBMO) com 21 relatos inéditos na espécie *M. obtusifolia* e 28 compostos em *M. rigida*, dos quais 27 foram citados pela primeira vez na espécie. O presente estudo permitiu estabelecer metodologias, parâmetros e especificações mais adequadas para a avaliação dos materiais vegetais das espécies analisadas do gênero *Monteverdia*.

Palavras-chave: *Monteverdia obtusifolia* Mart.; *Monteverdia rigida* Mart; Controle de qualidade; Validação analítica; Análise de Componentes Principais; Desreplicação.

ABSTRACT

Natural products present themselves as a rich source of substances for the development of new medicines, however, maintaining the quality of materials of plant origin presents problems related to the insufficiency of phytochemical data and specifications. The species *Monteverdia obtusifolia* Mart and *Monteverdia rigida* Mart are popularly known as "good name" and are used in folk medicine to treat gastritis and ulcers. Phytochemical studies have reported the presence of triterpenes, flavonoids and alkaloids in their chemical compositions. However, there are no quality control studies reported for the species. Thus, the objectives of this work were to carry out the quality control of plant materials, to validate analytical methodologies for the quantification of phenolic compounds in the ethanolic extracts obtained from the species and to verify the seasonal variations in the chemical composition of *M. obtusifolia*. Optimized parameters for extracting the markers, determining water in drugs, total and sulfated ashes, granulometric analysis of powders, limit testing of heavy metals, apparent density of solids and microbiological contamination were evaluated according to the methodologies of the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition. The quantifications of flavonoids (TF) and total phenolic compounds (TPC) were performed by a validated spectrophotometric method, using quercetin and gallic acid as standards. The chemical compositions of the species were evaluated by dereplication of the extracts obtained and seasonal variations were verified using multivariate analyzes (PCA / HCA). The crude ethanol extracts obtained from the leaves of *M. obtusifolia* (EEBMO) and leaves (F), stem (C), root bark (CR) and roots (R) of *M. rigida* were produced with particles containing $> 600 \mu\text{m}$ and $< 1200 \mu\text{m}$ in size and subjected to agitation, after optimization of the extraction conditions. The analytical method by (HPLC-PDA) for the markers (-)-Epigallocatechin (EPG), (+)-Catechin (CAT) and (-)-Epicatechin (EPI) was validated and presented compliance for all parameters established by the RDC 166/2017. It was possible to verify that the species presented richness of phenolic compounds, flavonoids and flavan-3-ols, with a higher prevalence for the months of October and November in the species *M. obtusifolia*, as well as in the extract from the leaves of *M. rigida*. The quenching used in *M. obtusifolia* did not promote significant statistical differences ($p < 0.05$) for the markers (EPG, CAT and EPI) when drying in an oven. The analysis of (PCA) confirmed the positive correlation between solar radiation and temperature, in addition to the negative effect of rainfall and humidity on the production of the evaluated markers (EPG, CAT, EPI, TF and TPC). The grouping performed by the HCA tool confirmed the data observed in the PCA with the collection of similar samples. Dereplication enabled the putative characterization of 25 phenolics in (EEBMO) with 21 unpublished reports in the species *M. obtusifolia* and 28 compounds in *M. rigida*, of which 27 were mentioned for the first time in the species. The present study made it possible to establish methodologies, parameters and specifications that are most appropriate for the evaluation of plant materials of the analyzed species of the genus *Monteverdia*.

Palavras-chave: *Monteverdia obtusifolia* Mart.; *Monteverdia rigida* Mart; Quality control; Analytical Validation; Photostability; Principal Component Analysis; Dereplication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição das espécies de Celastraceae no mundo.....	39
Figura 2. Mapa de distribuição das espécies de <i>Maytenus</i> no mundo.	42
Figura 3. Cladograma de reorganização do gênero <i>Maytenus</i>	45
Figura 4. Mapa de distribuição das espécies de <i>Monteverdia</i> no mundo.....	46
Figura 5. <i>M. obtusifolia</i> no local de coleta, município de Santa Rita-PB.....	49
Figura 6. <i>M. obtusifolia</i> no local de coleta, município de Santa Rita-PB.....	50
Figura 7. Aspecto de um ramo de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart.) Biral.	51
Figura 8. <i>M. rigida</i> no local de coleta, município de Boa Vista-PB.	54
Figura 9. Mapa de distribuição da espécie <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral	55
Figura 10. Aspecto de um ramo de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral.	56
Figura 11. Biossíntese dos flavonoides.	67
Figura 12. Biossíntese dos Flavan-3-óis.	68
Figura 13. Mapa do Estado da Paraíba com destaque para o município de Santa Rita-PB.....	96
Figura 14. Região de coleta da espécie <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart. no município de Santa Rita-PB.	99
Figura 15. Mapa do Estado da Paraíba com destaque para o município de Boa Vista-PB.	100
Figura 16. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Young Lin®.	115
Figura 17. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Shimadzu®.....	116
Figura 18. Resultados da avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.....	136
Figura 19. Cromatograma do padrão (-)-Epigalocatequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 30 µg/mL.	218
Figura 20. Cromatograma do padrão (+)-Catequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 13,5 µg/mL.	219
Figura 21. Cromatograma do padrão (-)-Epicatequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 6,6 µg/mL.	219
Figura 22. Cromatograma do extrato etanólico de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart. avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 1 mg/mL.	220

Figura 23. Cromatograma da fase móvel avaliada no parâmetro especificidade.....	220
Figura 24. Cromatograma da solução diluente avaliada no parâmetro especificidade.....	221
Figura 25. Cromatograma da solução diluente avaliada no parâmetro especificidade.....	221
Figura 26. Figura 33. Cromatogramas do extrato etanólico de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart.) Biral avaliados no parâmetro especificidade. Concentração de 1 mg/mL com adição de padrões.....	222
Figura 27. Pureza de pico do marcador (-)-Epigallocatequina.....	223
Figura 28. Pureza de pico do marcador (+)-Catequina.....	224
Figura 29. Pureza de pico do marcador (-)-Epicatequina.....	225
Figura 30. Cromatogramas sobrepostos da (-)-Epigallocatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (9 – 90 µg/mL).....	230
Figura 31. Cromatogramas sobrepostos da (+)-Catequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (4,05 – 40,5 µg/mL).....	232
Figura 32. Cromatogramas sobrepostos da (-)-Epicatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (3,30 – 13,2 µg/mL).....	235
Figura 33. Cromatogramas sobrepostos dos (EEB) de janeiro a dezembro de 2017, na concentração de 100%.....	253
Figura 34. Cromatogramas sobrepostos dos (EEBq) de janeiro a dezembro de 2017, na concentração de 100%.....	254
Figura 35. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de janeiro de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	254
Figura 36. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de fevereiro de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	255
Figura 37. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de março de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	255
Figura 38. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de abril de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	256
Figura 39. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de maio de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	256
Figura 40. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de junho de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	257

Figura 41. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de julho de 2017, na concentração de 100% da amostra.	257
Figura 42. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de agosto de 2017, na concentração de 100% da amostra.	258
Figura 43. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de setembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.	258
Figura 44. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de outubro de 2017, na concentração de 100% da amostra.....	259
Figura 45. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de novembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.	259
Figura 46. Cromatogramas sobrepostos do (EEB) x (EEBq) obtidos no mês de dezembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.	260
Figura 47. Cromatograma do pico base do EEBSE da espécie de <i>M. obtusifolia</i>	286
Figura 48. Dendograma de três composições químicas para 12 amostras de <i>M. obtusifolia</i> . G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3.....	299
Figura 49. Dendograma das variáveis analisadas por HCA.	300
Figura 50. <i>Heatmap</i> com a variação dos marcadores e perfil fenólico (qualitativo e quantitativo) dos extratos obtidos a partir das folhas de <i>M. obtusifolia</i> entre os meses de Janeiro a Dezembro de 2017.....	302
Figura 51. Cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>M. rigida</i> . Concentração de 1 mg/mL	307
Figura 52. Cromatograma do extrato etanólico do caule de <i>M. rigida</i> . Concentração de 1 mg/mL	307
Figura 53. Cromatograma do extrato etanólico das cascas da raiz de <i>M. rigida</i> . Concentração de 1 mg/mL	308
Figura 54. Cromatograma do extrato etanólico da raiz de <i>M. rigida</i> . Concentração de 1 mg/mL	308
Figura 55. Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral (1 mg/mL), com adição dos padrões (-)-Epigallocatequina (EPG), (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI).	309
Figura 56. Rede molecular das partes de <i>M. rigida</i>	311
Figura 57. Cromatograma do pico base da raiz (A), casca da raiz (B), caule (C) e folhas (D) da espécie de <i>M. rigida</i>	318

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Constituíntes químicos isolados de espécies da família Celastraceae.....	41
Quadro 2. Constituíntes químicos isolados do gênero <i>Monteverdia</i>	48
Quadro 3. Substâncias isoladas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral.....	53
Quadro 4. Constituíntes químicos isolados de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral.....	58
Quadro 5. Marcadores utilizados na validação dos extratos do gênero <i>Monteverdia</i> e suas respectivas estruturas.....	113

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1.** Obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEB) e extratos submetidos ao *quenching* (EEBq) das folhas de *Monteverdia obtusifolia* Mart..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de espécies, distribuição e traços morfológicos de distinção primários para os gêneros.....	44
Tabela 2. Critérios do sistema <i>Herb MaRS</i>	63
Tabela 3. Fatores potenciais a serem examinados durante os testes de robustez.	82
Tabela 4. Dados de coleta do material vegetal de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	97
Tabela 5. Índices pluviométricos registrados em Santa Rita-PB nos anos de 2014 e 2017.	98
Tabela 6. Dados climáticos do município de Santa Rita-PB.	99
Tabela 7. Ensaios de controle de qualidade dos materiais vegetais de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral e <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral.....	104
Tabela 8. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epigalocatequina.....	122
Tabela 9. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (+)-Catequina.....	123
Tabela 10. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epicatequina.....	123
Tabela 11. Resultados da avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.....	135
Tabela 12. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecção” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.	139
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) dos teores de água da droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	142
Tabela 14. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de água em drogas vegetais.....	143
Tabela 15. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecção” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletada no mês de junho de 2018.....	143

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) da determinação de teor de água das diferentes partes da droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i>	145
Tabela 17. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação do teor de água das diferentes partes de <i>M. rigida</i> .145	
Tabela 18. Resultados obtidos através da metodologia “Ensaio limite de metais pesados”, nas drogas vegetais secas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral, coletadas nos meses de janeiro a dezembro de 2017 e <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletada em junho de 2018.....	147
Tabela 19. Densidades aparente obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.	148
Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) da densidade aparente da droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	150
Tabela 21. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de densidade aparente de sólidos.	150
Tabela 22. Densidades aparentes obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletada no mês de junho de 2018.	151
Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) da densidade aparente da droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i> Mart.....	152
Tabela 24. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro densidade aparente da droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i> Mart.	153
Tabela 25. Tamanho médio de partículas obtidos através da metodologia para “Determinação da granulometria de pós”, nas drogas vegetais secas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletadas nos meses de janeiro a dezembro de 2017 e <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.	171
Tabela 26. Teores de cinzas totais obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas totais” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017. 173	
Tabela 27. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas totais da droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i>	175

Tabela 28. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas totais.....	175
Tabela 29. Teores de cinzas sulfatadas obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.....	175
Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas sulfatadas da droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i>	178
Tabela 31. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas sulfatadas.	178
Tabela 32. Teores de cinzas totais e cinzas sulfatadas obtidas através das metodologias farmacopeicas para “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), nas drogas vegetais secas <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.	179
Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas totais das diferentes partes da droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i>	182
Tabela 34. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas totais das diferentes partes de <i>M. rigida</i> .182	
Tabela 35. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas sulfatadas das diferentes partes da droga vegetal seca de <i>Monteverdia rigida</i>	183
Tabela 36. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas sulfatadas das diferentes partes de <i>M. rigida</i>	183
Tabela 37. Teores de flavonoides totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de flavonoides totais” (n = 3), nos extratos etanólicos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.....	184
Tabela 38. Teores de flavonoides totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de flavonoides totais” (n = 3), nos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.....	186
Tabela 39. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	191

Tabela 40. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEBq.....	192
Tabela 41. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	192
Tabela 42. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEB.....	192
Tabela 43. Teores de flavonoides totais obtidas através da metodologia validada para “Determinação de flavonoides totais” (n = 3), nas drogas vegetais secas <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.	193
Tabela 44. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia rigida</i>	194
Tabela 45. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides totais dos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia rigida</i>	195
Tabela 46. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.....	198
Tabela 47. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos etanólicos (EEBq) submetidos ao <i>Quenching</i> de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.....	200
Tabela 48. Análise de variância (ANOVA) do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	205
Tabela 49. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Fenólicos Totais do EEBq.....	205
Tabela 50. Análise de variância (ANOVA) do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	205
Tabela 51. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEB.....	206
Tabela 52. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia validada para “Determinação de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos	

etanólicos secos de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral coletadas em Junho de 2018.	207
Tabela 53. Análise de variância (ANOVA) do teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia rigida</i>	208
Tabela 54. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Fenólicos totais dos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia rigida</i> .	208
.....	208
Tabela 55. Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “ <i>Escherichia coli</i> ”, “ <i>Salmonella</i> ”, “ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ”, “ <i>Staphylococcus aureus</i> ” e “ <i>Candida albicans</i> ” para as drogas vegetais de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart.) Biral.....	213
Tabela 56. Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “ <i>Escherichia coli</i> ”, “ <i>Salmonella</i> ”, “ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ”, “ <i>Staphylococcus aureus</i> ” e “ <i>Candida albicans</i> ” para as drogas vegetais de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral.....	215
Tabela 57. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epigalocatequina (n=3)	228
Tabela 58. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (+)-Catequina (n=3)	230
Tabela 59. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epicatequina (n=3)	233
Tabela 60. Equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.	235
Tabela 61. Cálculo de interferência de efeito matriz (%EM) para os marcadores.	236
.....	236
Tabela 62. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epigalocatequina (n=3)	238
Tabela 63. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (+)-Catequina (n=3)	239

Tabela 64. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epicatequina (n=3)	241
Tabela 65. Resumo da análise estatística do parâmetro efeito matriz para os marcadores analisados	242
Tabela 66. Resumo dos limites de detecção e quantificação para os marcadores analisados	243
Tabela 67. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (-)-Epigallocatequina	244
Tabela 68. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (+)-Catequina	245
Tabela 69. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (-)-Epicatequina	246
Tabela 70. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigallocatequina.	249
Tabela 71. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina ..	250
Tabela 72. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina.	251
Tabela 73. Parâmetros de System suitability	252
Tabela 74. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart (EEB) obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017	261
Tabela 75. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart submetidos ao Quenching (EEBq) obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017	263
Tabela 76. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPG dos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	277
Tabela 77. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPG no EEB.	277
Tabela 78. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPG dos extratos etanólicos submetidos ao Quenching (EEBq) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	278
Tabela 79. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPG no EEBq.	278
Tabela 80. Análise de variância (ANOVA) do teor de CAT dos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	278

Tabela 81. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de CAT no EEB.....	279
Tabela 82. Análise de variância (ANOVA) do teor de CAT dos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	279
Tabela 83. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de CAT no EEBq.....	279
Tabela 84. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPI dos extratos etanólicos secos (EEB) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	280
Tabela 85. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPI no EEB.	280
Tabela 86. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPI dos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq) de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.	280
Tabela 87. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPI no EEBq.	281
Tabela 88. Caracterização dos compostos fenólicos presentes nas folhas do extrato bruto de <i>M. obtusifolia</i> por CLAE-IES-EMn.	283
Tabela 89. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart (EEB) obtidos a partir das coletas nos meses de janeiro a dezembro de 2017.....	305
Tabela 90. Caracterização dos compostos fenólicos presentes na folha (F), caule (C), raiz (R) e casca do caule (CR) de <i>M. rigida</i> por CLAE-IES-EMn.....	314

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Índices pluviométricos registrado no município de Santa Rita-PB nos anos de 2014 e 2017.....	98
Gráfico 2. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecação” (n = 3), de janeiro a dezembro de 2017.....	141
Gráfico 3. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecação” (n = 3) dos materiais vegetais secos de <i>Monteverdia rigida</i>	144
Gráfico 4. Densidades aparente obtidas através da metodologia “Determinação de densidade aparente” (n = 3), de janeiro a dezembro de 2017.....	149
Gráfico 5. Densidades aparentes obtidas através da metodologia “Determinação de densidade aparente” (n = 3) dos materiais vegetais de <i>Monteverdia rigida</i>	152
Gráfico 6. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Janeiro 2017).....	154
Gráfico 7. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Janeiro).....	154
Gráfico 8. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Fevereiro 2017).....	155
Gráfico 9. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Fevereiro).....	155
Gráfico 10. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Março 2017).....	156
Gráfico 11. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Março).....	156
Gráfico 12. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Abril 2017).....	157
Gráfico 13. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Abril)	157
Gráfico 14. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Maio 2017).....	158

Gráfico 15. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Maio).....	158
Gráfico 16. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Junho 2017).....	159
Gráfico 17. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Junho 2018).....	159
Gráfico 18. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Julho 2017)	160
Gráfico 19. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Julho)	160
Gráfico 20. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Agosto 2017).....	161
Gráfico 21. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Agosto)	161
Gráfico 22. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Setembro 2017).....	162
Gráfico 23. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Setembro)	162
Gráfico 24. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Outubro 2017).....	163
Gráfico 25. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Outubro).....	163
Gráfico 26. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Novembro 2017)	164
Gráfico 27. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Novembro)	164
Gráfico 28. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Dezembro 2017)	165
Gráfico 29. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Dezembro)	165
Gráfico 30. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018)	166

Gráfico 31. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018)	167
Gráfico 32. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco do caule de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018)	167
Gráfico 33. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco do caule folhas de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018).....	168
Gráfico 34. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco da casca da raiz de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018).....	168
Gráfico 35. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco da casca da raiz de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018).....	169
Gráfico 36. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco da raiz de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018).....	169
Gráfico 37. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco da raiz de <i>Monteverdia rigida</i> (Junho 2018)	170
Gráfico 38. Teores de cinzas totais obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas totais” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.	174
Gráfico 39. Teores de cinzas sulfatadas obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), na droga vegetal seca de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.....	177
Gráfico 40. Teores de cinzas totais e sulfatadas obtidas das drogas vegetais secas de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral	181
Gráfico 41. Curva de calibração (10 – 250 µg/mL) para doseamento de flavonoides totais expressos em equivalentes de Quercetina.	184
Gráfico 42. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólico secos, de Janeiro a Dezembro de 2017.....	186
Gráfico 43. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos submetidos ao <i>Quenching</i> , de Janeiro a Dezembro de 2017.....	187
Gráfico 44. Comparativo dos teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos	

etanólicos secos e extratos submetidos ao <i>Quenching</i> de <i>Monteverdia obtusifolia</i> , de Janeiro a Dezembro de 2017.	189
Gráfico 45. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos das diferentes partes de <i>M. rigida</i>	194
Gráfico 46. Curva de calibração (7,5 – 500 µg/mL) para doseamento de fenólicos totais expressos em equivalentes de Ácido gálico.....	197
Gráfico 47. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos Fenólicos Totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> , de Janeiro a Dezembro de 2017.	199
Gráfico 48. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos Fenólicos Totais” (n = 3) nos extratos etanólicos submetidos ao <i>Quenching</i> de <i>Monteverdia obtusifolia</i> , de Janeiro a Dezembro de 2017.	201
Gráfico 49. Comparativo dos teores de compostos Fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de compostos Fenólicos totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos e extratos submetidos ao <i>Quenching</i> de <i>Monteverdia obtusifolia</i> , de Janeiro a Dezembro de 2017.....	202
Gráfico 50. Teores de Compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos fenólicos totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos das diferentes partes de <i>M. rigida</i>	208
Gráfico 51. Regressão linear da curva de calibração (9 – 90 µg/mL) para o marcador (-)-Epigalocatequina.	229
Gráfico 52. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epigalocatequina.	229
Gráfico 53. Regressão linear da curva de calibração (4,05 – 40,5 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.....	231
Gráfico 54. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (+)-Catequina.	232
Gráfico 55. Regressão linear da curva de calibração (3,3 – 13,2 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.	234

Gráfico 56. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epicatequina.....	234
Gráfico 57. Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (9 – 90 µg/mL) para o marcador (-)-Epigalocatequina.....	239
Gráfico 58. Regressão linear da curva de calibração (4,05 – 40,5 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.....	240
Gráfico 59. Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (3,3 – 13,2 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.....	242
Gráfico 60. Teores do marcador (-)-Epigalocatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB), de Janeiro a Dezembro de 2017.....	265
Gráfico 61. Teores do marcador (-)-Epigalocatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.....	265
Gráfico 62. Teores do marcador (+)-Catequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB), de Janeiro a Dezembro de 2017 ..	266
Gráfico 63. Teores do marcador (+)-Catequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.	266
Gráfico 64. Teores do marcador (-)-Epicatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB), de janeiro a dezembro de 2017.....	267
Gráfico 65. Teores do marcador (-)-Epicatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.	267
Gráfico 66. Comparativo dos teores do marcador (-)-Epigalocatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.....	268
Gráfico 67. Comparativo dos teores do marcador (+)-Catequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.	268

Gráfico 68. Comparativo dos teores do marcador (-)-Epicatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.	269
Gráfico 69. Comparativo dos teores dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (EEB) obtidos de Janeiro a Dezembro de 2017.....	269
Gráfico 70. Comparativo dos teores dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de <i>Monteverdia obtusifolia</i> submetidos ao <i>Quenching</i> (EEBq) obtidos de Janeiro a Dezembro de 2017	270
Gráfico 71. Gráficos dos scores e loadings de PC1 e PC2 para os fatores climáticos avaliados.....	291
Gráfico 72. Gráficos dos scores e loadings de PC1 e PC2 para os extratos etanólicos brutos obtidos por CL-EM a partir das folhas de <i>M. obtusifolia</i> nos meses de Janeiro (A1PSMO) a Dezembro (A12PSMO) de 2017.....	293
Gráfico 73. Scores e loadings para avaliação dos marcadores nos extratos etanólicos brutos (EEB) das folhas de <i>M. obtusifolia</i> obtidos por CLAE-DAD nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017	296
Gráfico 74. Teores dos marcadores em extratos etanólicos obtidos das folhas, caule, cascas da raiz e raízes de <i>M. rigida</i>	306

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CG** - Cromatografia Gasosa
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-DAD** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos
- CLAE-IES-EM** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por espectrometria de massas com ionização tipo eletrospray
- CAT** – (+)-Catequina
- C18** - Octadecilsilano
- DP** - Desvio Padrão
- DPR** - Desvio Padrão Relativo
- EEMO** - Extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia*
- EEMOSE** - Extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* seco em estufa
- EEMR** - Extrato etanólico de *Monteverdia rigida*
- EPG** – (-)-Epigalocatequina
- EPI** – (-)-Epicatequina
- ICH** - International Conference on Harmonisation
- LOD** – Limite de detecção
- LOQ** - Limite de quantificação
- Mart** - Martius
- MeCN** – Acetonitrila
- MeOH** - Metanol
- mg** - Miligrama
- mL** - Mililitro
- mg/mL** - Miligrama por mililitro
- mm** - Milímetro
- n** - Número de amostras
- nm** - Nanômetro
- pH** - Potencial hidrogeniônico
- pKa** - Constante de dissociação ácida
- r** - Coeficiente de correlação
- r²** - Coeficiente de determinação

redox – Redução-oxidação

UV - Ultravioleta

UV-VIS - Ultravioleta-visível

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Geral.....	37
2.2 Específicos.....	37
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	39
3.1 Considerações sobre a família Celastraceae.....	39
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Monteverdia</i>	42
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral.....	48
3.4 Considerações sobre a espécie <i>Monteverdia rigida</i> (Mart) Biral.....	54
3.5 Controle de qualidade de drogas vegetais.....	59
3.5.1 Marcadores para controle de drogas vegetais.....	62
3.5.1.1 Considerações gerais e processo biossintético de flavonoides.....	65
3.5.1.1.1 Flavan-3-ol.....	68
3.5.2 Validação de metodologia analítica.....	72
3.6.1 Seletividade.....	73
3.6.2 Linearidade.....	74
3.6.3 Efeito Matriz.....	76
3.6.4 Precisão.....	76
3.6.4.1 Repetibilidade ou precisão intra-corrida.....	77
3.6.4.1.1 Precisão intermediária ou precisão inter-análise.....	77
3.6.5 Limite de detecção.....	78
3.6.6 Limite de quantificação.....	79
3.6.7 Exatidão.....	80
3.6.8 Robustez.....	81
3.6.9 <i>System suitability</i>	83
3.7 Sazonalidade.....	84
3.8 Análise multivariada.....	87
3.8.1 Análise exploratória de dados.....	88
3.8.1.1 Análise dos Componentes Principais (PCA).....	89
3.8.1.2 Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (HCA).....	90
3.9 Desreplicação.....	92
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	96

4.1 Material Botânico.....	96
4.2 Processamento das folhas de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart.) Biral.....	100
4.2.1 Obtenção do extrato etanólico bruto com <i>Quenching</i> (EEBq) das folhas.....	101
4.2.2 Avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo do material vegetal de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral..	101
4.2.3 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas secas em estufa.....	102
4.3 Processamento do material vegetal de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral....	103
4.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de <i>Monteverdia rigida</i> (Mart.) Biral.....	103
4.4 Controle de qualidade do material vegetal.....	103
4.4.1 Determinação de água em drogas vegetais.....	104
4.4.1.1 Método gravimétrico.....	105
4.4.2 Ensaio limite de metais pesados.....	105
4.4.3 Densidade aparente de sólidos.....	107
4.4.4 Determinação da granulometria de pós.....	107
4.4.5 Determinação de cinzas.....	108
4.4.5.1 Determinação de cinzas totais.....	108
4.4.5.2 Determinação de cinzas sulfatadas.....	108
4.4.6 Doseamento de flavonoides totais.....	109
4.4.7 Doseamento de compostos fenólicos totais.....	109
4.4.8 Determinação da contaminação microbiológica.....	110
4.4.8.1 Determinação do número total de microrganismos mesofílicos....	110
4.4.8.2 Pesquisa de patógenos.....	110
4.4.8.2.1 Bactérias gram-negativas bile tolerantes.....	110
4.4.8.2.2 <i>Escherichia coli</i>	111
4.4.8.2.3 <i>Salmonella</i>	111
4.4.8.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	111
4.4.8.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	112
4.4.8.2.6 <i>Candida albicans</i>	112
4.5 Padronização química.....	112
4.5.1 Substâncias químicas de referência.....	112

4.5.2 Solventes e reagentes.....	113
4.6 Validação de metodologia analítica.....	114
4.6.1 Especificidade.....	116
4.6.2 Linearidade.....	116
4.6.2.1 Solução estoque de (-)-Epigallocatequina.....	117
4.6.2.2 Solução estoque de (+)-Catequina.....	118
4.6.2.3 Solução estoque de (-)-Epicatequina.....	120
4.6.3 Efeito matriz.....	121
4.6.3.1 Efeito matriz para (-)-Epigallocatequina.....	122
4.6.3.2 Efeito matriz para (+)-Catequina.....	122
4.6.3.3 Efeito matriz para (-)-Epicatequina.....	123
4.6.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	124
4.6.5 Precisão.....	125
4.6.6 Repetibilidade.....	126
4.6.7 Precisão Intermediária.....	127
4.6.8 Exatidão.....	127
4.6.9 <i>System suitability</i>	129
4.7 Estudo de sazonalidade de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	130
4.8 Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis - PCA</i>).....	130
4.9 Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA).....	131
4.10 Doseamento de flavan-3-óis nos extratos de <i>Monteverdia rígida</i>	131
4.11 Análise do perfil químico por CLAE-IES-EM ⁿ	131
4.12 Rede Molecular.....	132
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
5.1 Avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo do material vegetal de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral.....	134
5.2 Controle de qualidade do material vegetal.....	139
5.2.1 Determinação de água em drogas vegetais.....	139
5.2.2 Ensaio limite de metais pesados.....	145
5.2.3 Densidade aparente de sólidos.....	147
5.2.4 Determinação da granulometria de pós.....	153
5.2.5 Determinação de cinzas.....	173

5.2.6 Doseamento de flavonoides totais.....	184
5.2.7 Doseamento de compostos fenólicos totais.....	198
5.2.8 Determinação de contaminação microbiológica.....	211
5.3 Validação de metodologia analítica.....	217
5.3.1 Especificidade.....	217
5.3.2 Linearidade.....	226
5.3.3 Efeito matriz.....	235
5.3.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	242
5.3.5 Precisão.....	243
5.3.6 Exatidão.....	248
5.3.7 System suitability.....	251
5.4 Estudo de sazonalidade de <i>Monteverdia obtusifolia</i> Mart.....	253
5.5 Desreplicação do extrato etanólico de <i>Monteverdia obtusifolia</i> (Mart) Biral.....	281
5.6 Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i> (PCA)).....	288
5.7 Análise de componentes hierárquicos (HCA).....	297
5.8 Doseamento de flavan-3-óis em extratos de <i>M. rígida</i>	303
5.9 Desreplicação dos extratos etanólicos de <i>Monteverdia rígida</i> (Mart) Biral com auxílio da rede molecular.....	310
6. CONCLUSÕES.....	322
REFERÊNCIAS.....	325
Apêndice A - Validação de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais.....	379
Apêndice B - Validação de metodologia analítica para doseamento de Compostos fenólicos totais.....	396
Apêndice C - Curva de calibração para quantificação dos marcadores em <i>Monteverdia rígida</i> (Mart.) Biral.....	415

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, os produtos naturais, como os organismos marinhos, microrganismos e plantas, tem representado uma rica fonte de substâncias para o desenvolvimento de novas terapias em diversas áreas. Os avanços científicos envolvendo estudos químicos e farmacológicos de várias espécies tem fomentado a utilização de produtos naturais no tratamento de enfermidades (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Segundo a OMS cerca de 80% da população, de países em desenvolvimento, já fez ou faz uso de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e destes, 85% empregam plantas medicinais. No Brasil, a situação é semelhante, entretanto o uso de plantas medicinais, muitas vezes, é o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos (MELRO *et al.*, 2020).

Diante deste cenário, o Brasil destaca-se das demais nações, pois é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, distribuídas em três ecossistemas marinhos e seis biomas terrestres. São relatadas mais de 46.355 espécies vegetais. As diferentes zonas climáticas beneficiam o surgimento de diferentes zonas biogeográficas (biomas) como a floresta amazônica, o pantanal, o cerrado e a caatinga (BRASIL, 2021). Apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização das plantas medicinais pela população, existe o consenso da insuficiência de estudos científicos acerca do assunto. Estima-se que apenas 0,4% das pesquisas científicas envolvam a flora nacional (BRASIL, 2012).

Os medicamentos à base de plantas, diferentemente dos medicamentos de origem sintética, são pouco estudados do ponto de vista da padronização química, avaliação farmacológica e toxicológica (LIU *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2021), o que reflete a dificuldade de integração das diversas áreas do conhecimento necessárias para completar a cadeia de produção dos fitoterápicos. A ausência de tecnologias apropriadas, a dificuldade de obtenção de matérias-primas com a qualidade desejada e a inexistência de metodologias e especificações de controle de qualidade para a maioria das espécies conhecidas ameaçam a segurança do consumo destes produtos (BHUSNURE *et al.*, 2019).

Aliado às dificuldades inerentes ao alcance da qualidade do produto, a maior parte da população ainda acredita que os produtos naturais vegetais, por

serem à base de plantas, são desprovidos de qualquer efeito tóxico ou interação com medicamentos e alimentos (SHARMA; SABHARWAL; DADA, 2021). Porém, sabe-se que, apesar do seu uso tradicional e da crença de sua inocuidade, as plantas medicinais podem produzir sérios danos ao organismo humano devido à sua complexa composição química e, portanto, seu uso deve estar condicionado à identificação botânica, padronização dos constituintes químicos com estudos evidenciando os efeitos de sazonalidade, avaliação prévia da sua toxicidade e do potencial farmacológico (SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2015; KELLOGG *et al.*, 2019).

Os estudos sazonais permitem a verificação das variações nas características das espécies quanto a sua composição química e metabolismo frente à distribuição geográfica, época de colheita, condições climáticas, exposição à luminosidade, período e condições de estocagem, entre outros (PETROPOULOS *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2019). Embora apresente-se como uma forma eficiente de avaliação da composição química dos vegetais, poucos estudos foram realizados com espécies do gênero *Monteverdia*. As avaliações sazonais descritas na literatura deste gênero são de flavonoides, taninos e triterpenos de *Monteverdia ilicifolia* Mart. e *Monteverdia aquifolium* Mart. demonstrando que existem variações nos teores dos metabólitos ao longo das estações do ano (YARIWAKE *et al.*, 2005; MOSSI *et al.*, 2009; 2010; ZERMIANI *et al.*, 2016; ANTUNES *et al.*, 2020).

Dentre as espécies de uso popular no Brasil estão a *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral conhecida popularmente como “bom-nome” ou “lenha-branca” e a *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral conhecida como “bom-nome”, “bom-homem”, “pau-de-colher”, “chapéu-de-couro” ou “casca-grossa”, ambas utilizadas pela população como antiulcerogênico, anti-inflamatório e antisséptico (ALMEIDA *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007; VELOSO *et al.*, 2017).

Os estudos fitoquímicos com estas espécies relataram a ocorrência de flavonoides, alcaloides e triterpenos pentacíclicos (ROCHA, 2003; SILVA *et al.*, 2008; ESTEVAM *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2010). E, recentemente, foram realizados estudos farmacológicos que avaliaram as propriedades antiulcerogênicas das espécies (MOTA, 2009; VIEIRA, 2013).

Por serem espécies utilizadas pela população com fins medicinais e, considerando a ausência de estudos de padronização fitoquímica com avaliação

de sazonalidade dos seus principais marcadores, este trabalho propõe-se a elucidar as variações nos percentuais dos marcadores químicos das espécies *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral e *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral, bem como padronizar e fornecer especificações confiáveis para o controle de qualidade dos materiais vegetais que são essenciais para o fornecimento de informações relacionadas à qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento do perfil químico e de controle de qualidade de espécies do gênero *Monteverdia* através da padronização de extratos obtidos e avaliar as variações sazonais de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral.

2.2 Específicos

- Realizar o controle de qualidade, pelo período de 12 meses, do material vegetal seco de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral, com padronização de metodologias e especificações, validar metodologia analítica para os respectivos extratos obtidos, conforme os parâmetros estabelecidos pela RDC Nº 166/2017 (BRASIL, 2017);
- Avaliar a sazonalidade e quantificar os marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), nos extratos etanólicos secos e submetidos ao *quenching* obtidos a partir das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral;
- Analisar o material vegetal obtido das folhas, caule, cascas e cerne da raiz de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral e quantificar os marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, por CLAE-DAD, nos extratos etanólicos secos obtidos.
- Anotar por Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (CLAE-IES-EM), os constituintes químicos presentes nos extratos secos de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral e *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral e utilizar a ferramenta da rede molecular para estabelecer um perfil químico mais detalhado;
- Aplicar as técnicas de análise multivariada de dados (PCA/HCA) para avaliação dos principais fatores climáticos relacionados à sazonalidade de metabólitos secundários de *M. obtusifolia*;

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 Fundamentação teórica

3.1 Considerações sobre a família Celastraceae

A família Celastraceae é constituída por aproximadamente 98 gêneros e 1264 espécies agrupadas em quatro subfamílias: Celastroideae, Hippocrateoideae, Salacioideae e Stackhousioideae. Compõe a ordem Celastrales, junto às famílias Lepidobotryaceae e Parnassiaceae (SIMMONS *et al.*, 2012). Encontra-se distribuída nos trópicos e subtrópicos do mundo, abrangendo o Norte Africano, América do Sul e regiões do Leste Asiático, com poucos representantes em regiões temperadas, predominando em zonas áridas (Figura 1) (MCKENNA *et al.*, 2011; BIRAL *et al.*, 2017).

Figura 1. Mapa de distribuição das espécies de Celastraceae no mundo.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14/Mar/2021.

<http://legacy.tropicos.org/Name/42000222>.

As espécies desta família consistem em árvores, arbustos, lianas lenhosas e, menos frequentemente, ervas perenes e anuais, com flores usualmente pequenas, actinomorfas, bi ou unissexuais, tetrâmeras ou pentâmeras, com disco nectarífero e ampla variedade de tipos de frutos e carúnculas (SIMMONS *et al.*, 2012).

Vários compostos biologicamente ativos foram obtidos de espécies desta família. De acordo com Shan *et al.* (2013), Celastraceae apresenta-se como uma das duas maiores fontes de triterpenos pentacíclicos do tipo friedelano, sendo

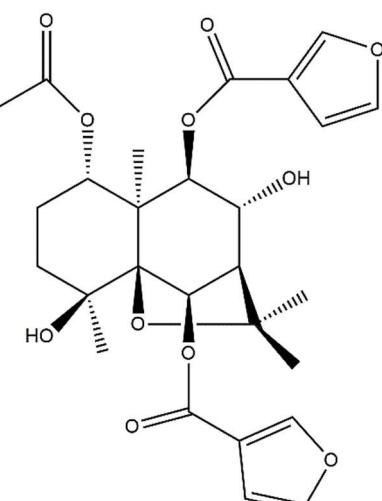
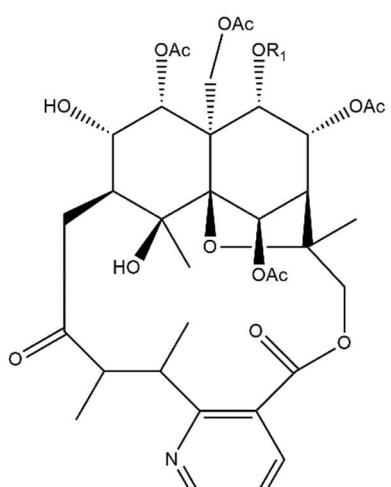
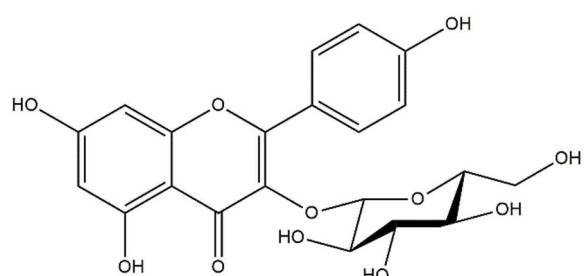
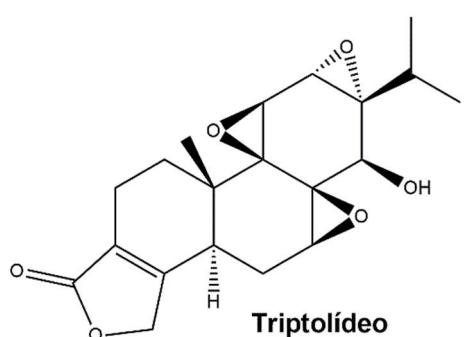
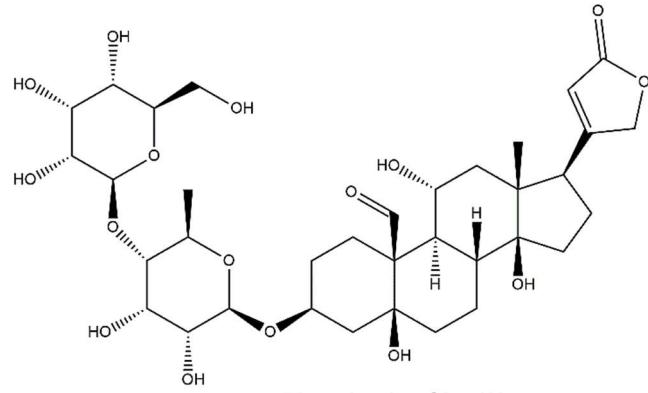
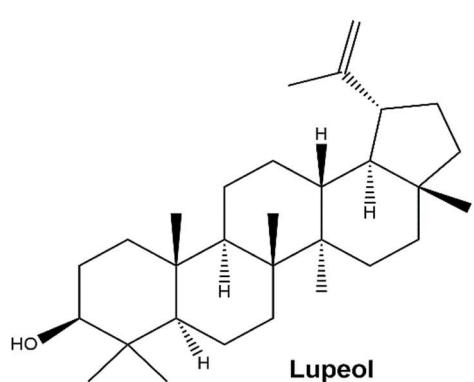
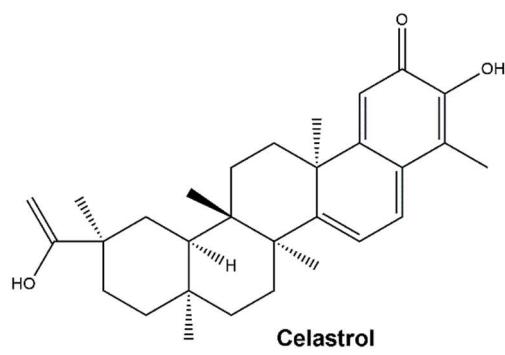
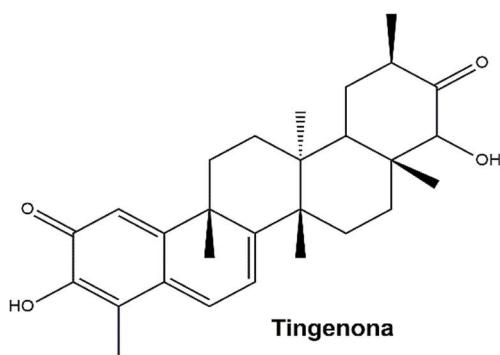
os dímeros e os quinonametídeos, restritos à esta família. Além de friedelanos, outros triterpenos como oleanano, ursano e lupano, sesquiterpenos, secofriedelanos e esteroides, alcaloides sesquiterpeno piridínicos, glicosídeos cardiotônicos, flavonoides glicosilados são frequentemente relatados em suas espécies (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; ALVARENGA; FERRO, 2006; SILVA *et al.*, 2008; NÚÑEZ *et al.*, 2012; SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014; GRISHKO; GALAIKO, 2016; CALLIES *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 2019) (Quadro 1).

Os triterpenos quinonametídeos são considerados os indicadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae, já que ocorrem somente em espécies vegetais desta família. Estes compostos exibem diversas atividades biológicas, sendo recentemente concentrada toda a atenção para a tingenona e pristimerina, substâncias isoladas das Raízes de várias espécies de Celastraceae, com elevada toxicidade para inúmeras linhagens celulares de câncer (SETZER *et al.*, 2001; GOMES, 2008; PAZ *et al.*, 2013; PÉREZ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2020).

Devido à variedade de metabólitos secundários, são relatadas atividades antiulcerogênica (SOMENSI *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2021), repelente e inseticida (FALKOWSKI *et al.*, 2020), imunossupressora (QIN *et al.*, 2019), antirreumática (GAN *et al.*, 2015), antibacteriana (SILVA, 2016; NIZER *et al.*, 2020), antitumoral (RODRIGUES *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2020), anti-HIV (GUTIÉRREZ-NICOLÁS *et al.*, 2014; OSORIO *et al.*, 2018) e anti-inflamatória (COMPAORÉ *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2020).

No Brasil são encontrados predominantemente cinco gêneros: *Maytenus* Juss., *Monteverdia* Rich., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (SIMMONS *et al.*, 2008; BIRAL *et al.*, 2017).

Quadro 1. Constituíntes químicos isolados de espécies da família Celastraceae.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

3.2 Considerações sobre o gênero *Monteverdia*

Maytenus é um dos maiores gêneros de Celastraceae. Está representado por aproximadamente 140 espécies amplamente distribuídas com ocorrência desde as regiões subantárticas da Terra do Fogo, no extremo sul do continente, até o sul dos Estados Unidos, nos estados da Flórida e Texas, numa variação de latitude entre 54°S e 27°N (Figura 2). Dentro desse limite ocorrem numa amplitude que vai desde o nível do mar até 3900 m de altitude em regiões andinas (BIRAL *et al.* 2015). As espécies estão presentes em praticamente todos os tipos de vegetação; além de variadas fisionomias florestais e savânicas, há espécies presentes em chacos secos e úmidos, salinas, mangues, campos rupestres, afloramentos rochosos e áreas de altitude em geral. O centro de maior diversidade é a América do Sul (LOESENER, 1942), e o Brasil o país que possui o maior número de espécies: 49 táxons (dos quais 36 são endêmicos) distribuídos em todos os domínios fitogeográficos e ao longo de todas as unidades da federação (BFG, 2015; BIRAL, 2016).

Figura 2. Mapa de distribuição das espécies de *Maytenus* no mundo.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14/Mar/2021.

Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Name/40015252>.

As espécies inclusas no gênero *Maytenus* normalmente caracterizam-se por apresentar a seção transversal dos ramos jovens achatada, carenada ou alada, folhas simples, alternas, margens inteiras, crenadas, serreadas ou espinoscentes, flores com disco intrastaminal, estames inseridos externamente

ao disco e alternados com as pétalas, achatados e com a base alargada, frutos capsulares deiscentes, bi ou trivalvares, e com carúncula envolvendo completamente ou parcialmente as sementes (MCKENNA et al., 2011; BIRAL, 2016).

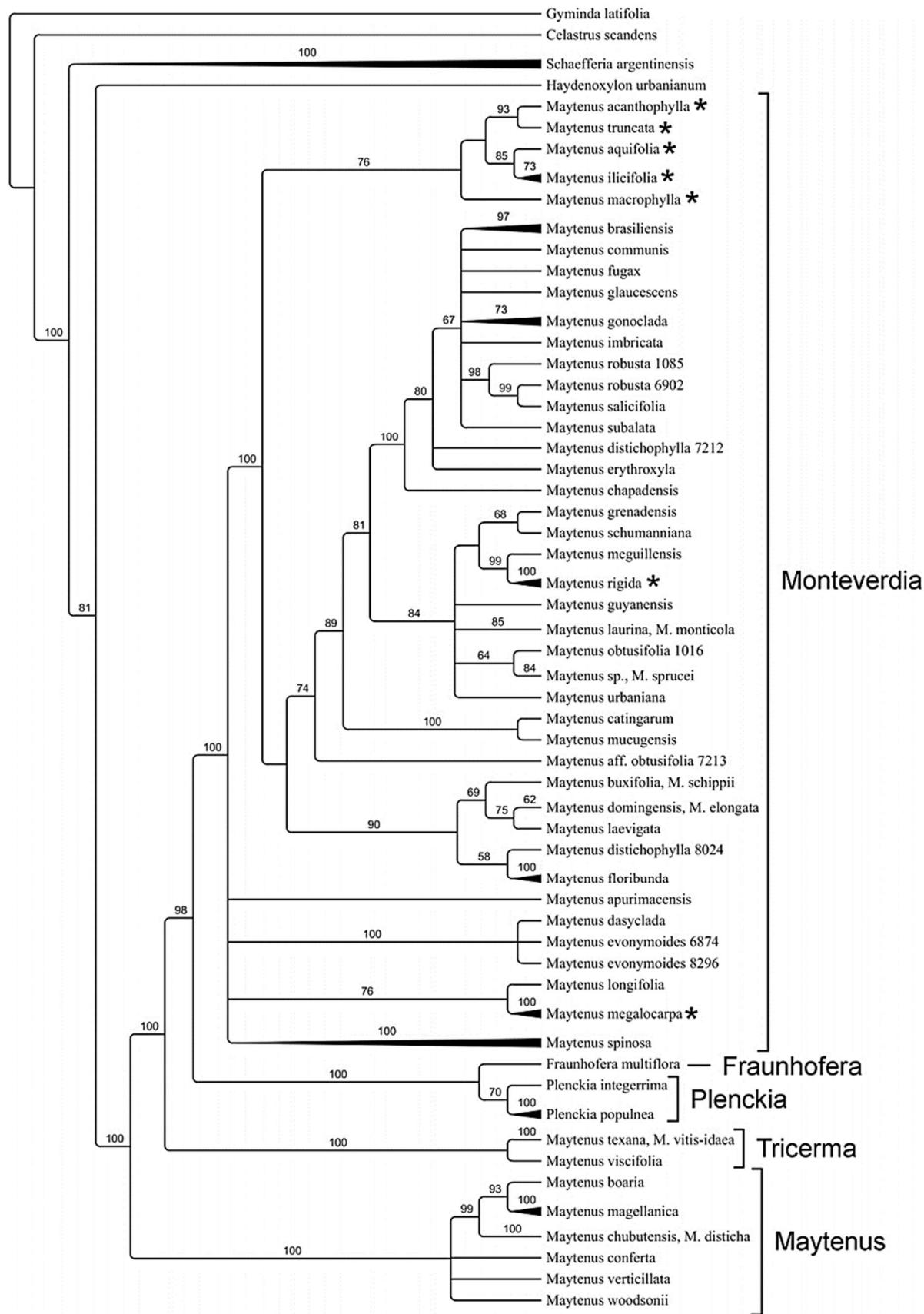
Os avanços nas análises botânicas permitiram o surgimento da sistemática filogenética, método de reconstrução de árvores evolutivas criado por Willi Hennig, que revolucionou as classificações biológicas quando comparado às escolas de sistemática anteriores, como a taxonomia evolutiva (SANTOS; KLASSA, 2012). Baseado nos conceitos da filogenia, o gênero *Maytenus* foi considerado polifilético e submetido a processos de delimitação mais adequados. Portanto, amparados pelas diferenças morfológicas e filogenéticas, Biral *et al.* (2017) propuseram um processo de reorganização das espécies, que culminou na redistribuição em 5 gêneros: *Maytenus*, *Tricerma*, *Plenckia*, *Fraunhofera* e *Monteverdia* (Tabela 1) (Figura 3).

Tabela 1. Número de espécies, distribuição e traços morfológicos de distinção primários para os gêneros.

Gênero	Espécies	Distribuição	Caracteres morfológicos
<i>Maytenus</i>	15 - 24	América do Sul subtropical, Andes da Argentina até Venezuela, páramos na Costa Rica e Panamá	Folhas cartáceas ou coriáceas, raramente carnudas, que são espirais ou dispostas disticamente; inflorescências cimosas ou fasciculadas axilares, às vezes reduzidas a uma flor individual; flores com dois ou três carpelos, um ou dois óvulos por carpelo; frutos capsulares com pericarpo membranáceo que aberto por duas ou três válvulas reflexas; arilos vermelhos ou amarelados que cobrem total ou parcialmente as sementes
<i>Tricerma</i>	4 ou 5	Noroeste da Argentina, Bolívia, Peru, Equador (incluindo Ilhas Galápagos), México, Cuba, Bahamas, Flórida e Texas	Folhas grossas e carnudas dispostas em espiral; inflorescências fasciculadas axilares; flores com três carpelos, um óvulo por carpelo; frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por três válvulas reflexivas; arilos vermelhos que cobrem completamente as sementes
<i>Plenckia</i>	4	Brasil Central, Paraguai e Bolívia (nas savanas)	Folhas cartáceas dispostas disticamente; inflorescências cimosas axilares; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; frutos samaroides com uma asa apical; arilo ausente
<i>Fraunhofera</i>	1	Terras Secas do Nordeste do Brasil	Folhas membranáceas ou cartáceas arranjadas disticamente; inflorescências racemosas axilares e terminais; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; frutas capsulares indeiscentes (ou drupas?); arilo ausente
<i>Monteverdia</i>	~123	Amplamente distribuído na região Neotropical	Folhas membranáceas, cartáceas ou coriáceas que são dispostas em espiral ou disticamente; inflorescências fasciculadas axilares ou inflorescências cimosas que às vezes são reduzidas a uma flor individual; flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo; frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por duas válvulas reflexas ou (raramente) verticais; arilos brancos que cobrem completamente as sementes

Fonte: BIRAL *et al.*, 2017.

Figura 3. Cladograma de reorganização do gênero *Maytenus*.



Fonte: BIRAL et al., 2017.

O gênero *Monteverdia* A. Rich foi descrito por Achille Richard (1845) com base em uma espécie única, *M. buxifolia*, de Cuba. Através deste estudo, Richard distinguiu *Monteverdia* de *Celastrus*, *Euonymus* e *Myginda* baseado em seus frutos coriáceos e indeiscentes com arilos que cobrem completamente as sementes. Grisebach (1866) tratou *Monteverdia* como sinônimo de *Maytenus* devido aos seus frutos e arilos semelhantes. Desde então, *Monteverdia* tem sido consistentemente tratado como um sinônimo de *Maytenus* (LOESENER, 1942; CARVALHO-OKANO, 1992; MORY, 2010; BIRAL, 2016).

Desta forma, Biral *et al.* (2017) sugeriram 123 novas combinações para *Monteverdia* de espécies de *Maytenus* que apresentam frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abrem por duas válvulas e tem as sementes cobertas completamente por arilos brancos. A atual distribuição do gênero *Monteverdia* pode ser observada na Figura 4.

Figura 4. Mapa de distribuição das espécies de *Monteverdia* no mundo.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14/Mar/2021.

Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Name/40022519>.

Estudos envolvendo diferentes espécies deste gênero, fitopreparações e substâncias isoladas demonstraram o seu vasto potencial medicinal (NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011). São relatadas atividades antimicrobiana (BRUNI *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2020), antitumoral (ZHAO *et al.*, 2021; MOMTAZ *et al.*, 2013), anticolite (MEES *et al.*, 2020), antiprotozoária

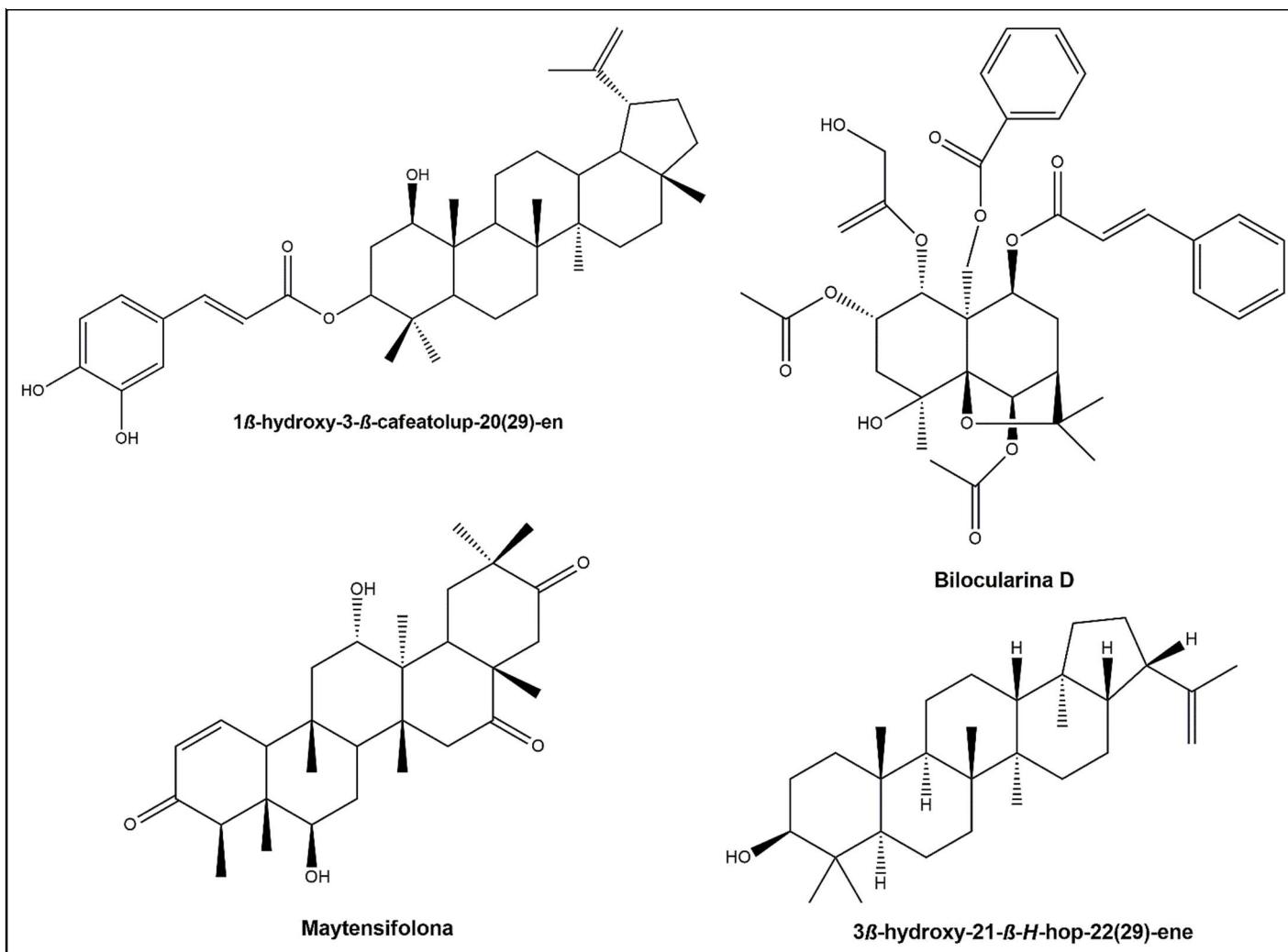
(VÁSQUEZ-OCMÍN *et al.*, 2017), vasorelaxante, diurética (LEME *et al.*, 2013), cicatrizante (LIMA *et al.*, 2010; MOURA, 2017), antialérgica (VELOSO *et al.*, 2019), inibidora da replicação do vírus HIV (OSORIO *et al.*, 2012), anti-inflamatória (WONFOR *et al.*, 2017) e auxiliar no tratamento da diabetes tipo II (ARDILES *et al.*, 2012).

Destacam-se, ainda, as atividades protetoras gástricas e antiulcerogênicas que já foram reportadas em várias espécies do gênero, como *M. robusta* (ANDRADE *et al.*, 2008; BRASIL, 2013; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018), *M. ilicifolia* (JORGE *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2007), *M. rigida* (VIEIRA, 2013), *M. aquifolium* (GONZALEZ *et al.*, 2001), *M. salicifolia* (SOMENSI *et al.*, 2020), *M. obtusifolia* (MOTA, 2009), *M. truncata* (SILVA *et al.*, 2005) e *M. distichophylla* (CALDAS-FILHO, 2013).

A maioria das atividades biológicas ocorrem devido à presença de compostos fenólicos (ANTUNES *et al.*, 2020), flavonoides (SOUSA *et al.*, 2017; TEBOU *et al.*, 2017), proantocianidinas (FERRAZ *et al.*, 2019), glicosídeos, terpenoides (MAGALHÃES *et al.*, 2012), alcaloides (SILVA *et al.*, 2008; CALLIES *et al.*, 2017) e esteroides (NIERO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017).

O gênero *Monteverdia* apresenta profusão em triterpenos, e o surgimento de novas estruturas tem sido relatado na literatura, a exemplo: maytensifolona (DUARTE *et al.*, 2013), 29-norlupan-3,20-diona (FIGUEIREDO, 2019), ácido ficusônico com moderada atividade citotóxica sobre células HeLa (DIN *et al.*, 2013), 3,16-dioxo-12 α -hidroxifriedelano (SILVA *et al.*, 2011), 3,4-seco-friedelan-3,11 β -olide, 3 β -hidroxi-21 β -H-hop-22(29)-en (SOUSA *et al.*, 2012), 1 β -hidroxi-3 β -cafeatolup-20(29)-en (DELGADO-MENDEZ *et al.*, 2008), sesquiterpenos dihidro- β -agarofurânicos, as bilocularinas (D-I) (WIBOWO *et al.*, 2016) e alcaloides sesquiterpenopiridínicos, vulcanicolina-A, cuzcoinina, vulcanicolina-B, jelskiina e vulcanicolina-C (CALLIES *et al.*, 2017) (Quadro 2).

Quadro 2. Constituíntes químicos isolados do gênero *Monteverdia*.

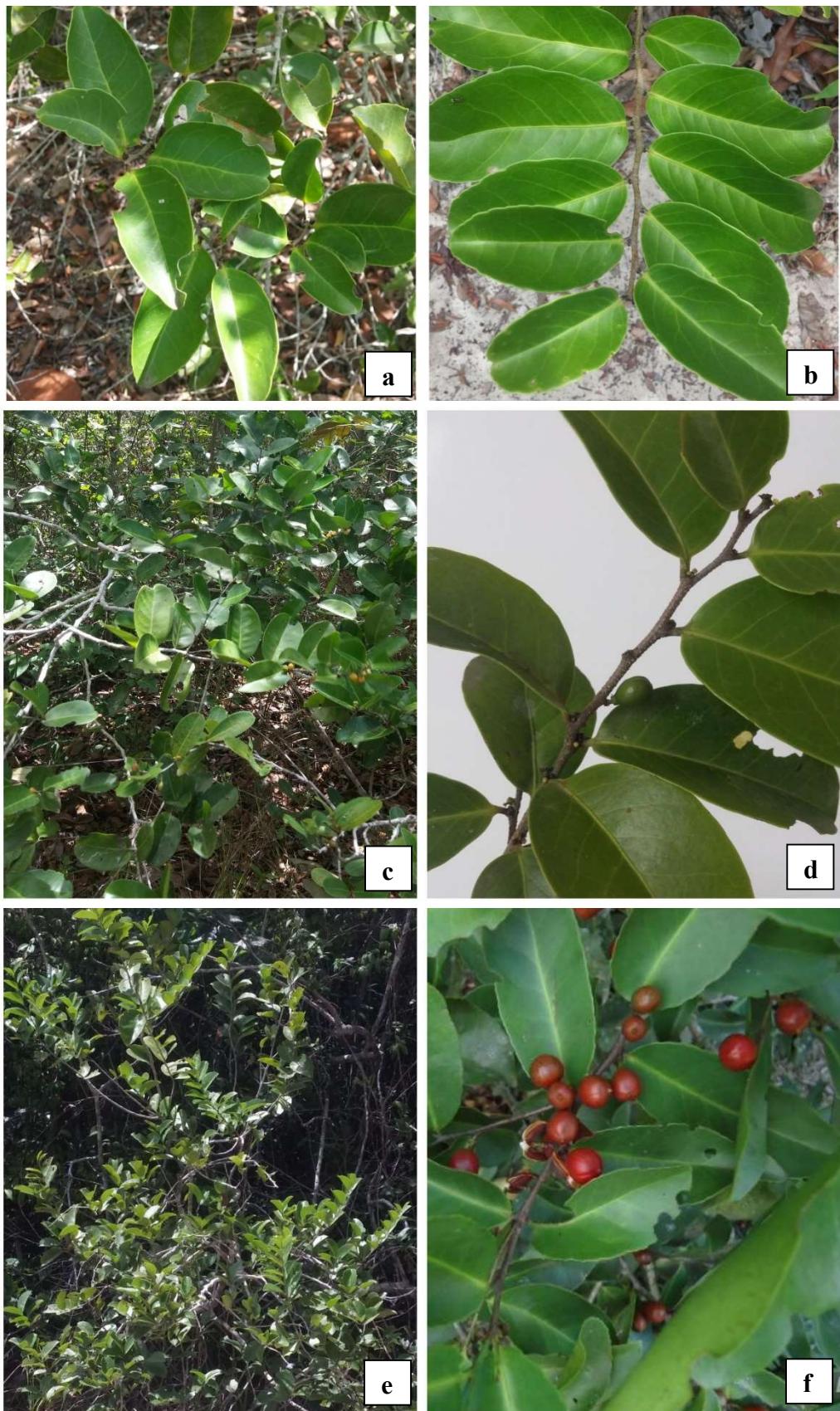


Fonte: ARAÚJO, 2021.

3.3 Considerações sobre a espécie *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral

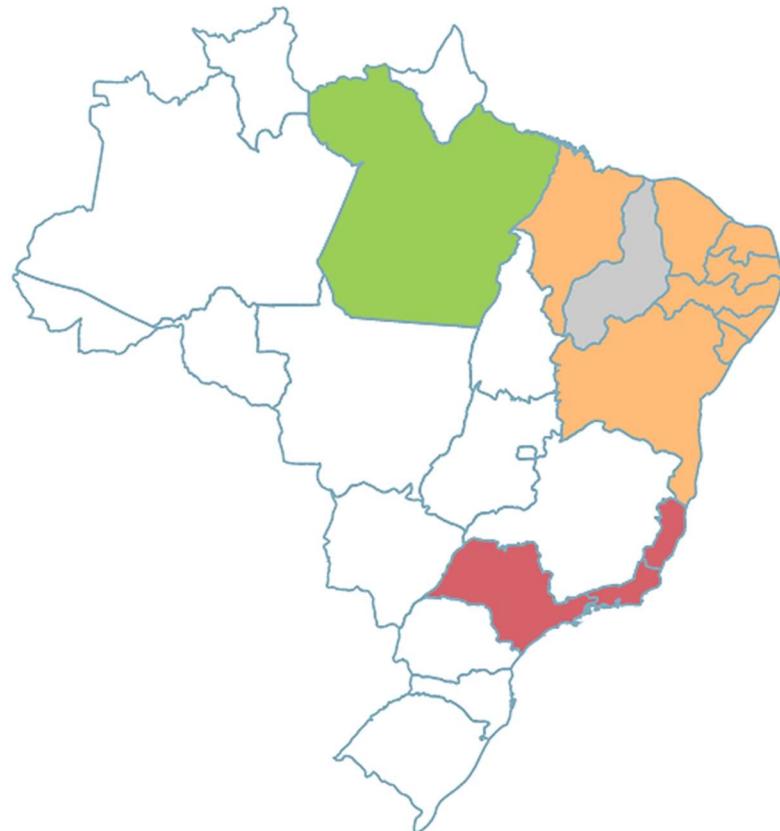
A espécie *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral é conhecida popularmente como “Bom-nome”, “Carne-de-anta”, “congonha-brava-de-folha-miúda” ou “lenha-branca” (Figura 5), suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais, inflamações e tratamento de câncer, enquanto as cascas do seu caule são utilizadas para o tratamento de úlceras na pele (AGRA *et al.*, 2007; VELOSO *et al.*, 2017). Apresenta distribuição em regiões litorâneas ocorrendo desde o estado do Pará a São Paulo. É abundante na restinga, principalmente do estado do Rio de Janeiro, embora também seja encontrada em regiões de maior altitude (BIRAL; LOMBARDI, 2020) (Figura 6).

Figura 5. *M. obtusifolia* no local de coleta, município de Santa Rita-PB.



Legenda: A-E - (Fonte: Diego Igor Fernandes, 2017); F - (Fonte: BIRAL; LOMBARDI, 2020a).

Figura 6. *M. obtusifolia* no local de coleta, município de Santa Rita-PB.

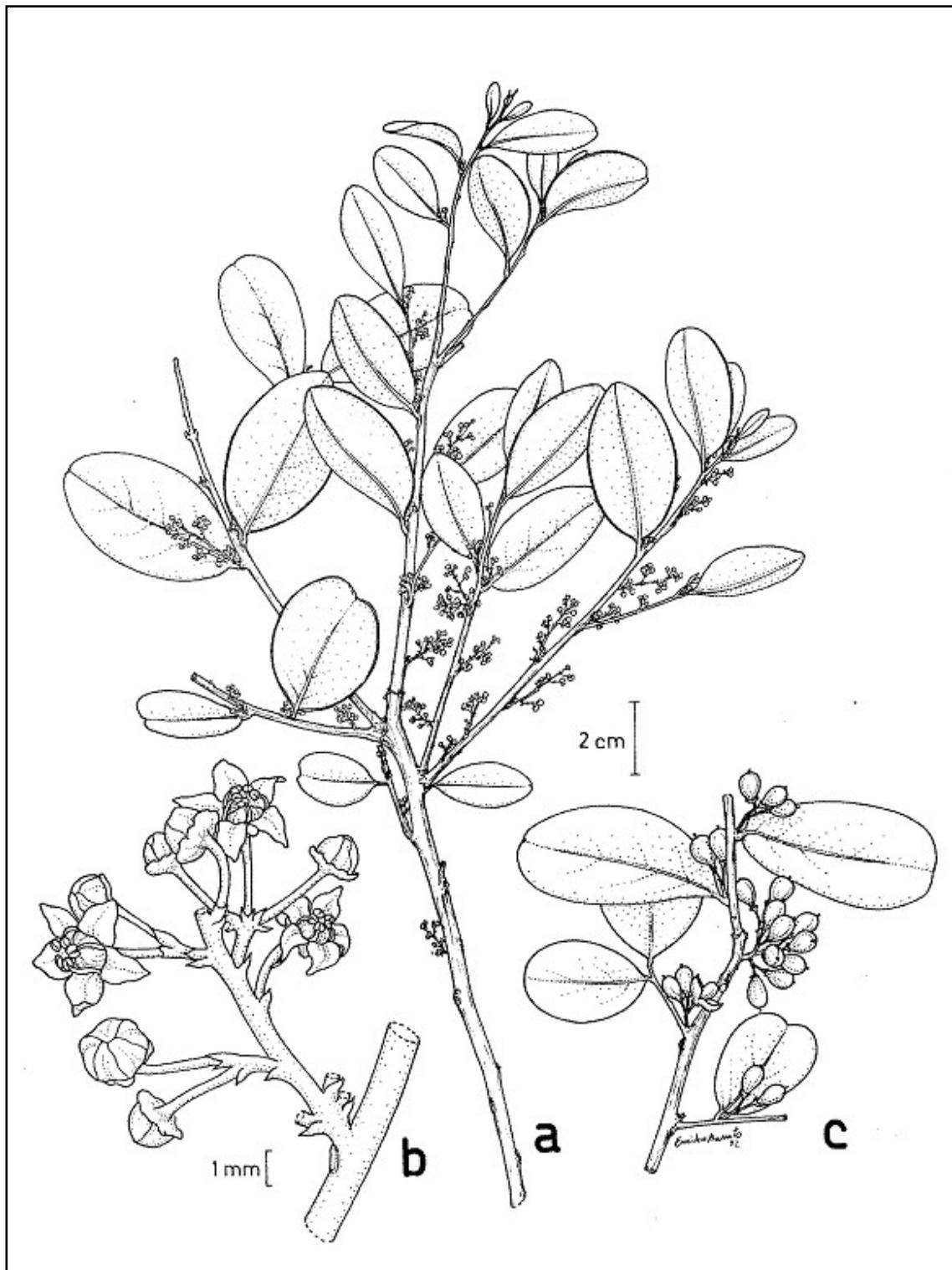


Legenda: Cores verdes: Região Norte; Cores laranjas: Região Nordeste; Cores vermelhas: Região Sudeste.

Fonte: BIRAL; LOMBARDI, 2020.

Monteverdia obtusifolia (Mart.) Biral apresenta-se como Arbusto ou árvore, medindo até 5 m; Ramos jovens glabros, cilíndrico-achatados. Pecíolo curto medindo de 2-4 mm; Lâmina coriácea, 3-11 × 2-6,5 cm, elíptica, oval, oboval ou orbicular, ápice agudo a obtuso, base cuneada a obtusa, margem subrevoluta, inteira a levemente subdenticulada, áspera, nervura primária saliente na face abaxial, nervuras secundárias capilares, não salientes, muitas vezes inconsíprias em ambas as faces. Inflorescência em cimeira paniculiforme, multiflora, eixo primário até 3,5 cm. Pedicelo 2-4 mm, bracteolado na base; sépalas ca. 2 mm, ovais; pétalas cerca 3 × 2 mm, lanceoladas; estames com filetes alargados na base; ovário saliente ou imerso no disco, estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; disco carnoso. Fruto cápsula orbicular, muitas vezes com estilete persistente; pericarpo maduro alaranjado (CARVALHO-OKANO, 1992; BIRAL, LOMBARDI, 2020) (Figura 7).

Figura 7. Aspecto de um ramo de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral.



Legenda: (a) Ramo com flores. (b) Detalhe da inflorescência. (c) Ramo com frutos.

Fonte: CARVALHO-OKANO, 1992.

Os primeiros estudos fitoquímicos realizados com as raízes desta espécie levaram ao isolamento de triterpenos quinonametídeos, como a tingenona, 22-

hidroxitingenona e pristimerina (LUCA *et al.*, 1978). Em seguida, foram relatados o isolamento de triterpenos pentacíclicos da série friedelano, lupano, oleanano e ursano, como a friedelina, 7-oxofriedelina, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-11 α -hidroxi-20(29)-lupeno, 3 β -11 α -dihidroxi-20(29)-lupeno (FREIRE, 1998), 3 β -hidroxi-9,12-en-ursano, 3 β -hidroxi-9,12-en-oleanano, 3 β -hidroxi-11,13-en-oleanano e o alcaloide piranoquinolínico N-metil-flindersina (SOUSA, 1998).

Silva *et al.* (2008) utilizando folhas e raízes de *M. obtusifolia*, isolaram e identificaram quatro triterpenos da série friedelano: 7-oxofriedelina, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, friedelina e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico; quatro flavonoides: 4'-O-metil(-)-epigalocatequina (ouratea-catequina), ouratea-proantocianidina A, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina. Ao avaliar o extrato etanólico obtido a partir das folhas de *M. obtusifolia*, Andrade *et al.* (2017) relataram o isolamento e identificação do triterpeno 3 β - Friedelanol pela primeira vez na espécie. O Quadro 3 apresenta algumas substâncias isoladas na espécie.

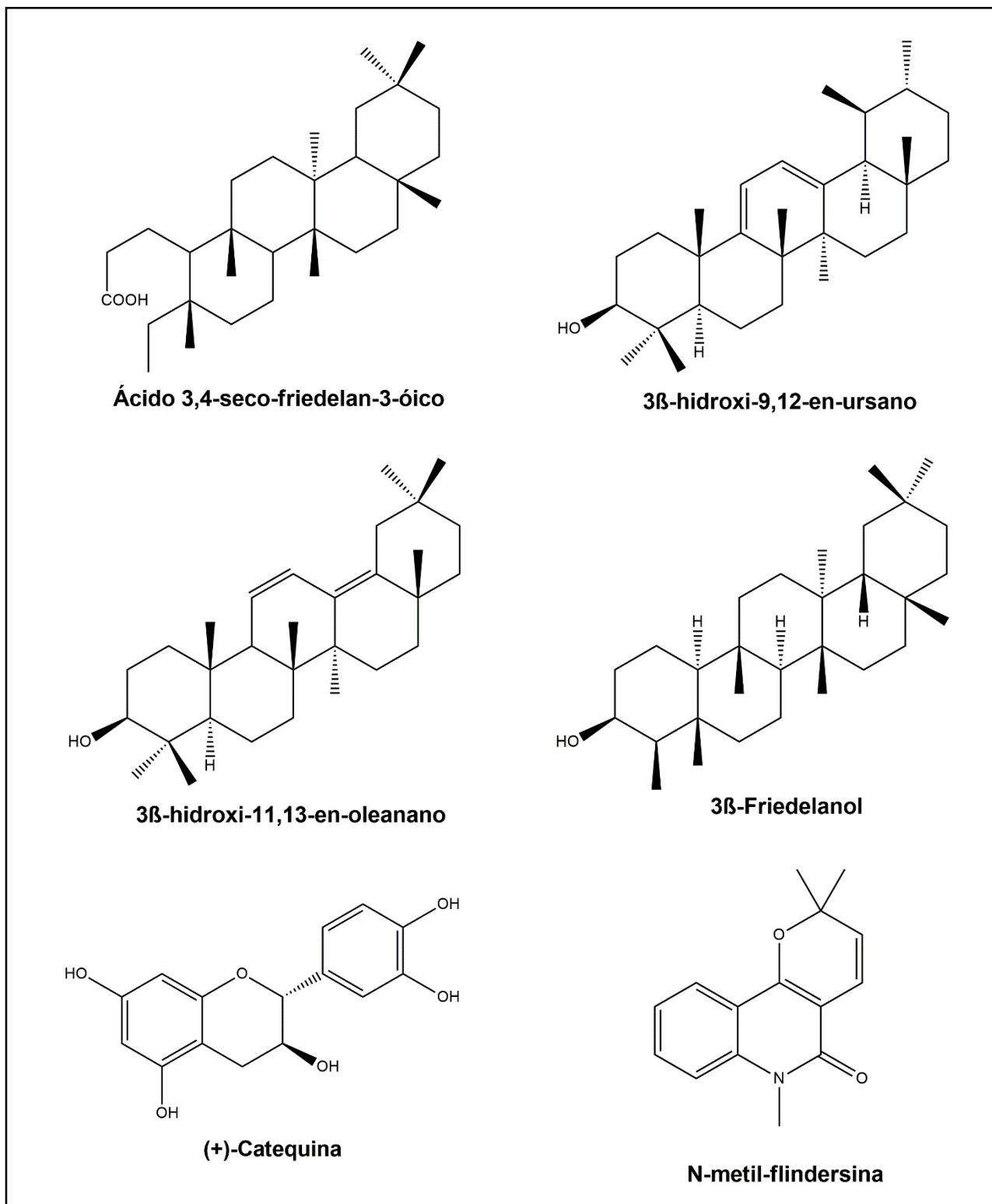
Ao avaliar as propriedades farmacológicas da espécie, Sousa e Almeida (2005) observaram ação depressora do sistema nervoso central e efeito neuroléptico por ação dopaminérgica central do extrato clorofórmico de suas Raízes. Ainda, considerando a tradicionalidade de uso das espécies deste gênero para o tratamento de gastrites e úlceras, Mota (2009) verificou a atividade gastroprotetora do extrato etanólico e fase acetato de etila das folhas, que envolve, entre outros mecanismos, a participação de grupamentos sulfidrila e estímulo ao processo cicatricial da úlcera gástrica.

Ao avaliar o óleo essencial obtido das folhas da espécie, Medeiros *et al.* (2010), relataram atividade antimicrobiana frente à 5 cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 18739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 9610) e 5 cepas fúngicas: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC 13803), *Candida tropicalis* (LM 37), *Candida guilliermondii* (LM V70), *Aspergillus flavus* (LM 247).

Araújo (2015), utilizando as folhas de *M. obtusifolia*, avaliou a composição química, do extrato etanólico bruto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com desenvolvimento de metodologia para a quantificação da (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, controle de qualidade do material vegetal e avaliação da fotoestabilidade do extrato. No mesmo estudo

também foram observadas alta capacidade antioxidante do extrato e relevante atividade antimicrobiana frente a bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos.

Quadro 3. Substâncias isoladas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral.



3.4 Considerações sobre a espécie *Monteverdia rigida* (Mart) Biral

Monteverdia rigida (Mart.) Biral, é uma espécie vegetal popularmente conhecida como “bom-nome”, “bom-homem”, “cabelo-de-negro” ou “pau-de-colher”, nativa do nordeste brasileiro. As cascas do seu caule são utilizadas na medicina popular para tratamento de infecções, inflamações, reumatismo e câncer. O seu uso externo é recomendado para úlceras e afecções de pele (ANDRADE-LIMA, 1989; ALMEIDA *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007) (Figura 8). Esta espécie pode ser encontrada em distintas formações vegetais (Mata Atlântica, Mata de Altitude, Campo Rupestre), com predominância em áreas secas da Caatinga, de solo compacto e cascalhento. Distribui-se entre os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe, Minas Gerais e Goiás (CARVALHO-OKANO, 1992; BIRAL, LOMBARDI, 2020) (Figura 9).

Figura 8. *M. rigida* no local de coleta, município de Boa Vista-PB.



Legenda: A-B-D - (Fonte: ARAÚJO, 2018). C - (Fonte: BIRAL; LOMBARDI, 2020b)

Figura 9. Mapa de distribuição da espécie *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral



Legenda: Cores laranjas: Região Nordeste; Cores amarelas: Região Centro-Oeste; Cores vermelhas: Região Sudeste

Fonte: BIRAL; LOMBARDI, 2020b.

Apresenta-se como árvores a arbustos (até 6 m de altura), inermes; ramos jovens achatados ou raramente carenados, glabros, lenticelados; folhas dísticas, patentes, pecíolos subnulos a 2 mm de comprimento, lâminas 2,4-10,1 x 1,2-4,5 cm, elípticas, cordadas ou ovadas, base obtusa, cordada ou aguda, margens espinescentes, com cinco a quatorze pares de espinhos distribuídos regularmente, planas, ápice agudo, obtuso ou truncado, mucronado ou não, coriáceas, pruinosas, concolores, nervura primária plana na face adaxial, promínula na face abaxial, nervuras secundárias promínulas ou planas em ambas as faces; inflorescências fasciculadas, multifloras, pedicelos 2-9 mm; flores pentâmeras, biloculares, dois óvulos por lóculo; frutos 6-9 x 5-7 mm, sferoides, bivalvares, pericarpo lenhoso, 1 semente, envolta totalmente por arilo (BIRAL; LOMBARDI, 2020) (Figura 10).

Figura 10. Aspecto de um ramo de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral.



Legenda: (a) Ramo com flores. (b) Detalhe do ramo com lenticelas e inflorescências.

Fonte: CARVALHO-OKANO, 1992.

Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie revelaram a presença de triterpenos da série lupano como o rigidenol (11 α -hydroxy-lup-20(30)-en-3-one) (MARTA *et al.*, 1979; GONZALEZ *et al.*, 1982), lup-20(29)-eno-3 β ,30-diol e lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol; triterpenos da série friedelano como a friedelan-3-ona e o friedelan-3 β -ol (MARTUCCIELLO *et al.*, 2010) e quinonametídeos como a tingenona, 20-hidroxitingenona e 22-hidroxitingenona (MONACHE *et al.*, 1973).

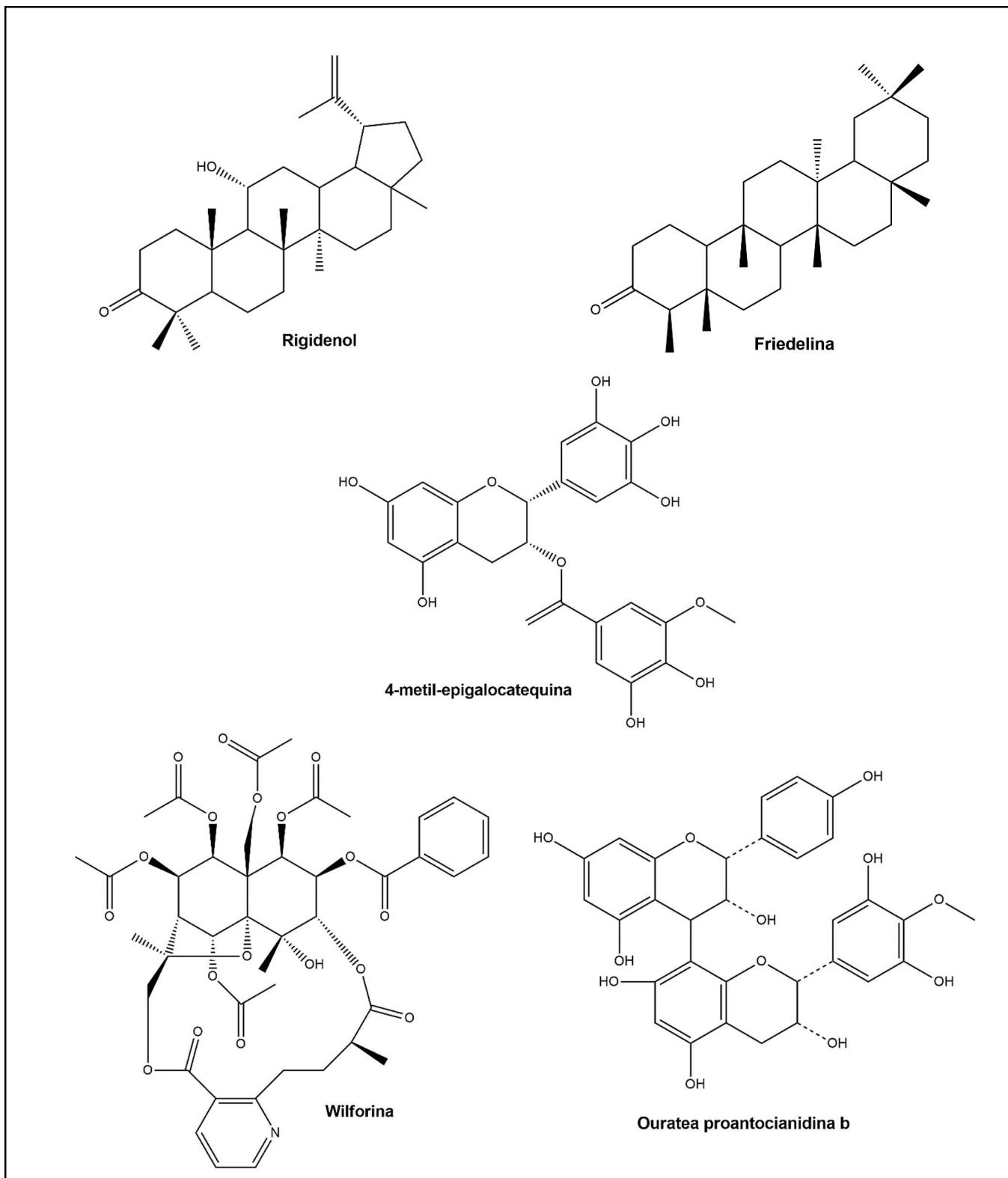
Segundo Monache *et al.* (1976) foram isolados uma catequina metilada e proantocianidinas como as ouratea-proantocianidina A e B do extrato metanólico das cascas da raiz da espécie. Também foram relatados o isolamento de alcaloides sesquiterpeno piridínicos como a Wilforina obtida a partir do extrato das raízes (MONACHE; MARINI-BETTOLO; BERNAYS, 1984) (Quadro 4).

Ao avaliar o perfil fitoquímico comparativo dos extratos aquosos, etanólicos e frações obtidos das folhas e entrecasca de *M. rigida*, Estevam (2006) destacou que os extratos aquosos e os etanólicos de folhas e entrecascas apresentaram similaridade entre os grupos de metabólitos secundários presentes: triterpenos, flavonoides, catequinas, saponinas, esteroides, flavononois, fenóis e quinonas. Os resultados diferiram quanto a presença de antocianidinas e antocianinas que foram encontradas nos extratos da entrecasca; os taninos e xantonas foram encontrados em ambos extratos etanólicos. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira *et al.* (2016) que relataram a presença de alcaloides na composição das folhas e entrecascas.

Os estudos farmacológicos realizados com extratos obtidos da casca do caule de *M. rigida* demonstraram atividade antinociceptiva (DIAS *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2012), anti-inflamatória, antidiarréica, antiespasmódica, antiulcerogênica (SANTOS *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2012), antiproliferativa (MARTUCCIELLO *et al.*, 2010) e citotóxica frente à linhagem celular de macrófagos J774 (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Em análises com os extratos etanólico, aquoso, clorofórmico, acetato de etila e hidroalcoólico da entrecasca do caule da espécie, foi possível observar atividade antibacteriana *in vitro* frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (ESTEVAM *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Quadro 4. Constituíntes químicos isolados de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Com vistas a iniciar o processo de padronização do controle de qualidade do material vegetal de *M. rigida*, Correia *et al.* (2018) avaliaram diferentes técnicas analíticas como microscopia eletrônica de varredura (MEV) com

espectroscopia dispersiva de energia, análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria (TG), utilizando o modelo de Ozawa para avaliação dos parâmetros cinéticos e cromatografia gasosa acoplada à pirólise / espectrometria de massa (PYR- GC / MS) e estabeleceram parâmetros para a caracterização do pó de diferentes tamanhos de partículas. Enquanto Araújo *et al.* (2018) relataram os primeiros resultados de controle de qualidade físico-químico para a espécie. Foram avaliados a perda por secagem, cinzas totais, metais pesados, densidade, teor de flavonoides e compostos fenólicos totais, além da quantificação dos marcadores (+)-Catequina e (-)-Epicatequina por CLAE-DAD, estabelecendo um melhor perfil para a caracterização do material vegetal.

3.5 Controle de qualidade de drogas vegetais

A qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal, derivados e medicamentos fitoterápicos pode ser avaliada por meio de análises químicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas, de acordo com especificações preconizadas por compêndios oficiais como farmacopeias, códigos oficiais e monografias específicas confeccionadas por órgãos reguladores internacionais como a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), Agência Europeia de medicamentos (EMA, 2011), Agência Americana de medicamentos (FDA, 2016), Associação Americana de Produtos vegetais (AHPA, 2021), entre outros.

A matéria-prima vegetal é suscetível à variabilidade em seus constituintes, podendo variar em decorrência de fatores como a procedência do material vegetal, tempo e época de coleta, diferentes condições ambientais de cultivo (luz, umidade, temperatura, solo), estágio de desenvolvimento, disponibilidade hídrica, variações genotípicas e quimiotípicas, presença de xenobióticos ou defensivos agrícolas, secagem e armazenamento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012; ZHAO; MA; LI, 2018). Sendo necessário a realização do controle de qualidade em todas as fases da linha de produção para garantir a uniformidade desde a droga vegetal ao medicamento fitoterápico final (INDRAYANTO, 2018).

Os avanços científicos tem facilitado o processo de seleção de espécies. Diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas para o cultivo de tecidos vegetais que favorecem a biossíntese de determinados metabólitos de interesse.

Estes estudos fornecem possibilidades sem precedentes para atingir a produção em massa de ingredientes ativos, evitar a contaminação por elementos tóxicos ou substâncias inadequadas, além de tornar possível o monitoramento de fatores relacionados ao desenvolvimento vegetal e que possam interferir no valor terapêutico dos produtos obtidos (DJORDJEVIC, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Entretanto, é importante considerar que estas espécies consistem em misturas complexas compostas por uma diversidade de metabólitos secundários cuja atividade biológica, pode ser atribuída ao conjunto ou efeito sinérgico entre as mesmas (JURGONSKI *et al.*, 2019). Estes fatores aliados à ausência de estudos de padronização química da maioria das espécies vegetais utilizadas, tornam essenciais as análises de controle de qualidade.

Dessa forma, o processo de controle da qualidade de materiais vegetais deve priorizar a confirmação da identidade da amostra, que pode ser realizado por análises botânicas utilizando métodos macro e microscópicos, além de investigações químicas e cromatográficas (EMA, 2011; WHO, 2011; FDA, 2016; AHPA, 2021). Estas análises devem averiguar a presença de substâncias que possuam relação com as atividades terapêuticas ou possibilitem a identificação inequívoca das espécies, conhecidos como marcadores químicos ou quimiotaxonômicos (LI *et al.*, 2008; WHO, 2017).

Neste contexto, ainda podem estar envolvidas análises para a caracterização organoléptica, identificação do órgão vegetal correspondente, pesquisa de materiais estranhos, avaliação de metais pesados, teor de umidade, cinzas totais, cinzas sulfatadas e análises quantitativas relacionadas aos componentes - biomarcadores ou marcadores – e impressões digitais qualitativas dos extratos obtidos, além da quantificação de ensaio do classes como flavonoides totais, compostos fenólicos totais, alcaloides totais que caracterizem a espécie (HIEN *et al.*, 2011; MANIKANDASELVI; VADIVEL; BRINDHA, 2016). Caso não haja um controle correto, a variabilidade intrínseca dos produtos naturais pode resultar em subdoses ou overdoses de entidades químicas ativas ou intoxicações por contaminações do material (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011).

A fitoquímica clássica dispõe de técnicas que permitem a caracterização e detecção de grupos de metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides, terpenos e cumarinas por meio de uso de reações colorimétricas ou processos

cromatográficos como a cromatografia em coluna aberta e em camada delgada. Contudo alguns inconvenientes são observados nas duas técnicas, a primeira apresenta baixa sensibilidade ou inespecificidade, visto que as espécies vegetais são compostas por diferentes classes de metabólitos que podem interferir nas análises. Já a segunda, demanda grandes volumes de solvente orgânico, tempo e requer um trabalho minucioso para análise das amostras coletadas. Existe, também, maior risco de exposição do analista aos materiais utilizados, apesar disso, estas podem ser as únicas técnicas reconhecidas disponíveis para alguns laboratórios (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; ZHANG *et al.*, 2013; HENRIQUE *et al.*, 2014; MENDOZA *et al.*, 2020).

O aperfeiçoamento da cromatografia permitiu o surgimento de técnicas modernas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que usada em escala analítica permite a análise das matérias-primas e seus derivados. Em escala preparativa, possibilita o isolamento de substâncias de matrizes vegetais complexas que podem ser utilizadas como padrões para quantificação. Após o processo de purificação, os compostos são determinados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas como a Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de massas e Infravermelho para confirmação da sua autenticidade, viabilizando pesquisas de atividades biológicas e maior conhecimento quimiotaxonômico dos vegetais (ALAERTS *et al.*, 2012; SPICER *et al.*, 2017; QU *et al.*, 2017).

Atualmente, o processo de identificação estrutural e caracterização *online* de substâncias por meio das técnicas hifenadas de espectrometria e espectroscopia (CLAE-EM, CLAE-RMN, CLAE-RMN-EM) permitiram a resolução de limitações como a manutenção da qualidade do extrato, isolamento em pequenas quantidades de substâncias e complexidade estrutural das moléculas, proporcionando a realização de estudos metabolômicos e *screening* de extratos sincronizados a testes de atividades biológicas, com desreplicação de forma rápida e eficiente (TAWFIKE; VIEGELMANN; EDRADA-EBEL, 2013; BOUFRIDI; QUINN, 2016; OPPONG-DANQUAH *et al.*, 2018; RAHEEM *et al.*, 2019). Retomando a pesquisa de produtos naturais como uma área de destaque na descoberta e desenvolvimento de fármacos (KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2019).

A metabolômica tem sido usada como uma ferramenta poderosa para a análise e avaliação da qualidade de medicamentos derivados de produtos naturais. Sua aplicabilidade no controle de qualidade e padronização é crescente visto que estas matérias-primas são compostas por centenas de substâncias das mais variadas classes. As técnicas mais comuns consistem em RMN, CG-EM e CL-EM em combinação com análises estatísticas multivariadas, incluindo análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (LEE *et al.*, 2017).

Nos dias atuais, o controle de qualidade dos medicamentos derivados de produtos naturais é realizado por CLAE e especificado por um ou mais marcadores. Para criar uma estrutura de qualidade superior e evitar drogas adulteradas, é necessário determinar e estabelecer padrões baseados em vários componentes usando perfis metabólicos e impressões digitais com aplicação de ferramentas analíticas adequadas (LI *et al.*, 2013; THOA *et al.*, 2020).

3.5.1 Marcadores para controle de drogas vegetais

A definição de marcadores fitoquímicos encontrada na literatura apresenta-os como sendo constituintes quimicamente definidos ou grupos de constituintes de origem vegetal com interesse para fins de controle, independentemente de exibirem ou não atividade terapêutica. Diferentemente dos princípios ativos sintéticos encontrados nos medicamentos, os marcadores vegetais consistem em misturas complexas de substâncias e servem para calcular a quantidade de metabólitos secundários em espécies vegetais, seus derivados ou produtos finais preparados à base de plantas. Podem ser classificados em duas categorias sendo marcadores ativos os constituintes ou grupos de constituintes, geralmente aceitos, como contribuintes ou responsáveis pela atividade terapêutica. E marcadores analíticos que são constituintes ou grupos de constituintes para fins analíticos (EMA, 2010; FDA, 2016).

De modo ideal, a escolha dos marcadores químicos usados para a garantia da qualidade dos materiais vegetais deve sempre prezar pela escolha de substâncias que estejam envolvidas nas suas propriedades farmacológicas e/ou apresentem riscos toxicológicos (BENSOUSSAN *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2021). Para fins de controle de qualidade, os marcadores podem ser divididos

em várias categorias, como componentes majoritários, terapêuticos, tóxicos, característicos, entre outros. E, devido a fatores como as variações edafoclimáticas, idade da espécie vegetal, processos de colheita, armazenamento e manipulação para preparo de produtos, estes marcadores podem não ser adequados ou aplicáveis para determinação da qualidade do material analisado, sendo necessário um estudo total de controle de qualidade com avaliação do perfil químico ou metabolômico para garantia da qualidade dos mesmos (RIVERA-MONDAGÓN *et al.*, 2017).

Com vistas a auxiliar no processo de escolha dos marcadores adequados, Bensoussan *et al.* (2015) propuseram um sistema de classificação de marcadores que podem ser utilizados para determinação da qualidade de materiais vegetais e seus derivados. O "Sistema de classificação de marcadores de vegetais" (*Herb MaRS*) organiza as substâncias em classes (x, 0, 1, 2, 3, 4 e 5) de acordo com as suas contribuições nas atividades farmacológicas e/ou toxicológicas. De acordo com os autores, os marcadores que apresentarem classificações 3, 4 e 5 devem ser testados, visto que apresentam características farmacológicas ou toxicológicas diretas. Enquanto os que forem categorizados nas classificações mais baixas (x, 0, 1 e 2) não precisam ser analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios do sistema *Herb MaRS*.

Classificação	Descrição
x	Nenhum relatório de estudos de bioatividade está disponível para este composto
0	(1) A atividade do composto não está relacionada à indicação para as doenças de interesse. Ou (2) Nenhum há substância química de referência pura disponível.
1	(1) A atividade do composto está indiretamente relacionada aos sintomas da doença de interesse. Ou (2) As concentrações dos compostos são bastante baixas nos materiais vegetais ou seus derivados (<5µg/g). Ou (3) A atividade do composto não é suportada pelo uso tradicional ou terapêutico da espécie vegetal.

(1) A atividade do composto está relacionada aos sintomas da doença de interesse, mas somente um estudo de qualidade para amparar esta atividade.

E

2 (2) As concentrações dos compostos são relativamente baixas nos materiais vegetais ou seus derivados (5–50µg/g).

E

(3) A bioatividade ou efeito farmacológico do composto é consistente com seu uso tradicional ou atual.

(1) A atividade do composto está relacionada aos sintomas da doença de interesse, mas somente um estudo de qualidade para amparar esta atividade.

E

3 (2) A concentração dos compostos é relativamente alta nos materiais vegetais ou seus derivados (>50µg/g).

E

(3) A bioatividade ou efeito farmacológico do composto é consistente com seu uso tradicional ou atual.

(1) A atividade do composto está relacionada aos sintomas da doença de interesse e existem mais de dois estudos de qualidade para dar suporte à atividade.

E

4 (2) A concentração dos compostos é relativamente alta nos materiais vegetais ou seus derivados (>50µg/g).

E

(3) A bioatividade ou efeito farmacológico do composto é consistente com seu uso tradicional ou atual.

(1) O composto é muito tóxico e necessita ser rastreado para cumprir o limite de segurança (genotóxico ou carcinogênico a 1,5µg / dia).

OU

(2) A atividade do composto está relacionada aos sintomas da doença de interesse e existem mais de dois estudos de qualidade para dar suporte à atividade.

E

5 (3) A concentração dos compostos é relativamente alta nos materiais vegetais ou seus derivados (>50µg/g).

E

(4) A bioatividade ou efeito farmacológico do composto é consistente com seu uso tradicional ou atual.

E

(5) O composto e/ou seus metabólitos são biodisponíveis.

Legenda: X – O composto, atualmente, é impróprio; 0 – menos adequado; 5 – o mais adequado para controle de qualidade; n/a – não disponível.

Fonte: Adaptado de Bensousson *et al.* (2015).

Entre os principais marcadores utilizados para avaliação da qualidade de espécies vegetais, destacam-se os alcaloides, terpenoides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas e outros tipos de metabólitos secundários que podem ser analisados qualitativamente/quantitativamente por métodos cromatográficos. Cada tipo de composto necessita de equipamentos e detectores apropriados, dessa forma, é possível combinar uma variedade de dispositivos entre cromatografia líquida, gasosa, espectrofotometria, espectroscopia e os seus sensores (KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012; JING *et al.*, 2013).

A maioria dos flavonoides, ácidos fenólicos, antraquinonas e cumarinas apresentam absorção UV forte e característica. Dessa forma, o detector UV pode ser considerado adequado para esses compostos. Entretanto, o UV pode não ser boa escolha para saponinas e outros compostos que não têm absorção de UV devido à ausência de duplas ligações conjugadas. Neste caso, a espectrometria de massas é o detector que pode detectar a maior variedade de compostos. Relativamente, o analisador de armadilha de íons (*ion trap*) é mais adequado para elucidação estrutural de compostos desconhecidos do que o analisador quadrupolo devido à sua capacidade de análise EM/EM. A maioria dos estudos disponíveis na literatura empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou de ultra eficiência (CLUE) acoplada a diversos detectores demonstrando que a técnica é bastante versátil e confiável para a identificação e quantificação de metabólitos em materiais vegetais e seus derivados (XIAOHUI; YI; YIYU, 2006; ZENG *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2020).

3.5.1.1 Considerações gerais e processo bioquímico de flavonoides

Os flavonoides pertencem a uma grande família de compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis. Levando em consideração o processo evolutivo das plantas, é digno de nota destacar que os compostos fenólicos possuíram um papel fundamental para a adaptação à vida das espécies no planeta (HICHRI *et al.*, 2011). Todas as plantas terrestres contêm flavonoides que estão presentes em todos os órgãos do vegetal, variando a sua concentração, a depender da sua necessidade. Ultimamente são conhecidos pelos efeitos propostos para a saúde, sendo abundantes em frutas e chás (PRASAD *et al.*, 2010; DEL VALLE *et al.*, 2020).

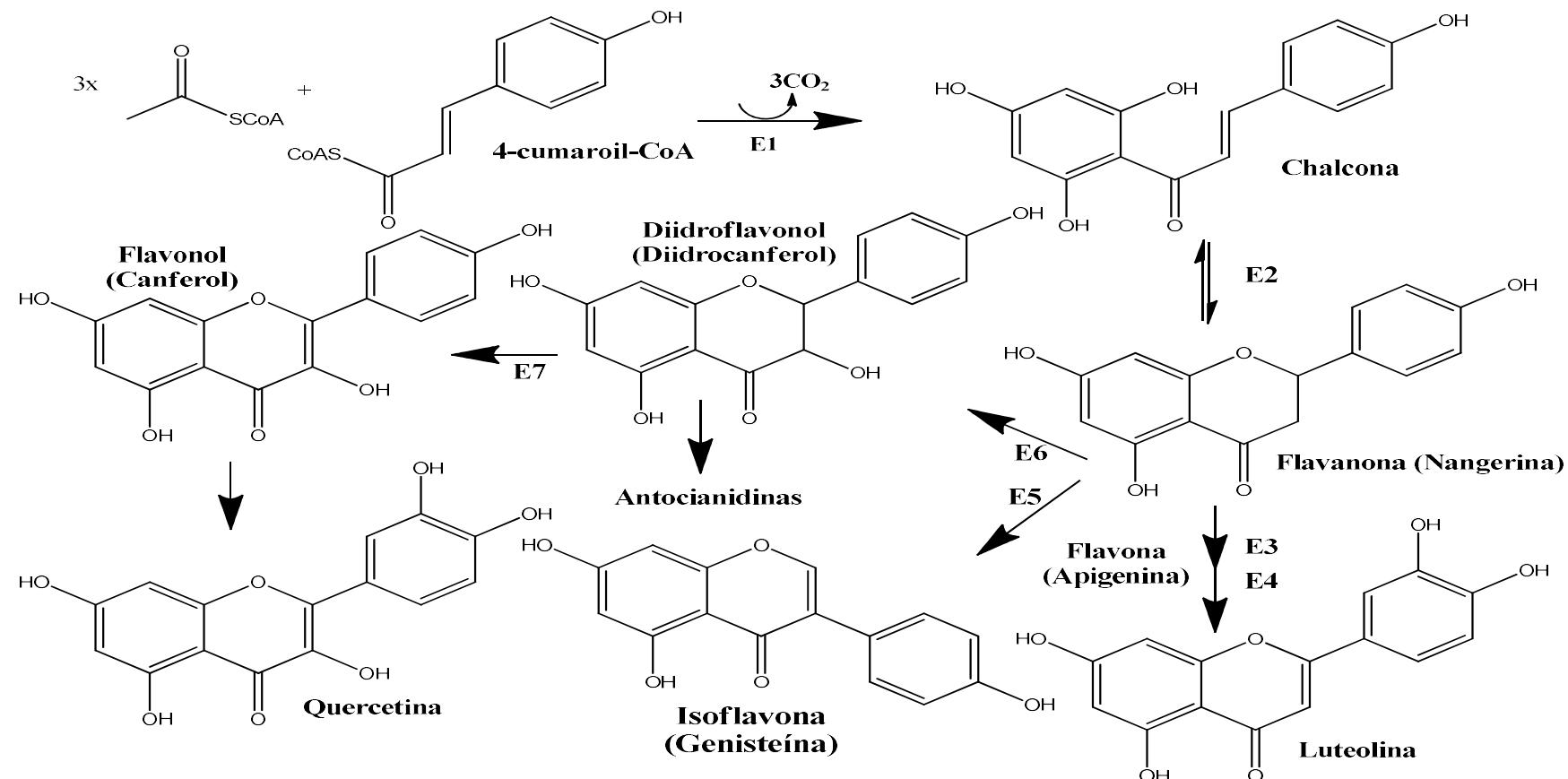
Quando biossintetizados pelas plantas, os flavonoides possuem uma grande variedade de funções, onde pode-se citar: pigmentação das flores, processo de desenvolvimento, polinização e, principalmente, proteção contra radiação ultravioleta e patógenos (TOHGE; PEREZ DE SOUZA; FERNIE, 2018; BABENKO *et al.*, 2019).

Diversas atividades biológicas desses metabólitos secundários foram verificadas em humanos, tendo destaque: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana, neuroprotetora, pró-apoptóticas, antiproliferativa, entre outras (NORDEEN *et al.*, 2013; BALDISSEROTTO *et al.*, 2015; MOURA, 2017; SOUSA *et al.*, 2017; TEBOU *et al.*, 2017).

Quimicamente, os flavonoides englobam uma média de 6000 moléculas identificadas, consistindo em dois anéis aromáticos com seis átomos de carbono cada (anel A e B), conectados por um heterociclo com três átomos de carbono (anel C) (FENG; HAO; LI, 2017). A classificação dos flavonoides baseia-se no nível de oxidação do heterociclo C, na presença de substituições de hidroxilos e metilas nos anéis A e B, como também, em modificações suplementares, tais como: glicosilação (glicose, ramnose, galactose, arabinose e, em menor grau, dissacarídeos), acilação (ácidos cumárico e cafeico) e a polimerização (HICHRI *et al.*, 2011; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A biossíntese dos flavonoides (Figura 11) se dá por uma rota mista: a via do acetato e a do ácido chiquímico. A rota do acetato permite a formação do anel A do núcleo flavonoídico ao passo que, a rota do ácido chiquímico, fornece a fenilalanina e o ácido cinâmico para formar o anel B e uma ponte com três átomos de carbono para se unir ao anel A, formando o anel C. A chalcona pé gerado como o primeiro flavonoide da via (DEWICK, 2009; NABAVI *et al.*, 2020).

Figura 11. Biossíntese dos flavonoides.



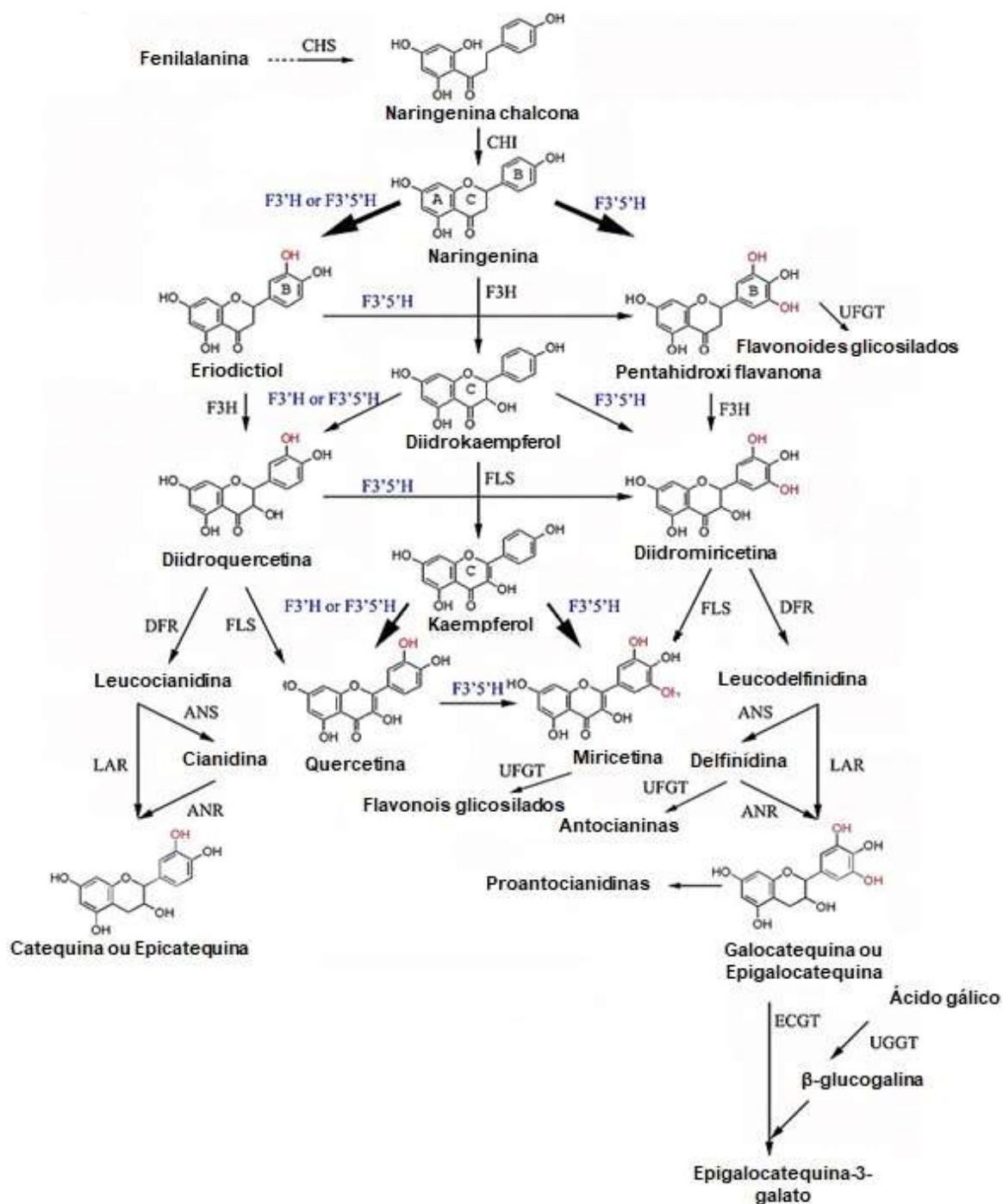
Legenda: **E1** – Chalcona sintase, **E2** – Chalcona isomerase, **E3** – Flavona sintase, **E4** – Flavona sintase II, **E5** – Isoflavona sintase, **E6** – Flavanona-3-hidroxilase e **E7** – Flavonol sintase.

Fonte: DEWICK, 2009; ARAÚJO, 2021.

3.5.1.1.1 Flavan-3-ol

Flavanóis, também conhecidos como catequinas, são metabólitos secundários do grupo dos flavonoides caracterizados pelo grupo hidroxila na posição 3, ausência de carbonila na posição 4 (4-C=O) e conjugação entre os anéis A e B. Os principais membros desta classe são catequina e epicatequina. E apresentam interesse científico por serem as unidades constituintes das proantocianidinas (KUMAR; PANDEY, 2013). A biossíntese desta classe está apresentada na Figura 12.

Figura 12. Biossíntese dos Flavan-3-óis.



Legenda: Biossíntese de flavonoids e flavanóis. CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3', 5'-hidroxilase; DFR, diidroflavanol 4-redutase; FLS, flavonol sintase; LAR, leucoantocianidina redutase; ANS, antocianidina sintase; ANR, antocianidina redutase; UFGT, UDP-glicose flavonoide glicosiltransferase; UGGT, UDP-glicose galool-1-O- β -D-glicosiltransferase; ECGT, epicatequina: 1-O-galool- β -D-glicose O-galooltransferase;

Fonte: Adaptado de WANG *et al.* (2014); SANTOS *et al.*, 2021.

Nos vegetais, desempenham importante função na proteção contra micro-organismos, fungos, insetos e herbívoros (SHARMA *et al.*, 2019). Atuam na sinalização celular em caso de espécies invasoras produzindo a *ent*-catequina [(-) - catequina] para prevenir a proliferação de plantas vizinhas. Este flavanol pode acionar a produção de oxigênio reativo, bem como ativar cascatas de sinalização de cálcio que promovem a morte celular das células de raízes adjacentes (DUKE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013). Os flavan-3-óis promoveram capacidade de tolerância a altos níveis de chumbo (até 1mg Pb/g de material seco) em algumas espécies vegetais (KAMACHI *et al.*, 2005).

Em humanos, eles mostram atividades cardiovasculares, anticancerígenas, antiobesidade e efeitos antivirais (KERMEZ *et al.*, 2006; FRIEDMAN, 2006; ARON; KENNEDY, 2008). Entretanto, destacam-se as suas propriedades gastroprotetoras e antiulcerogênicas, sendo alvo de estudo de diversos pesquisadores.

Em estudo realizado utilizando o galato de epigalocatequina nas concentrações de (0,5, 1, 2, 3 e 5 mg/kg, via oral, em ratos) foi possível observar sua atividade antiúlcera no modelo de AINEs, relacionando a sua capacidade de redução dos mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo presentes em condições patológicas de ulceração. O mecanismo associado a esse efeito envolve a redução dos níveis de óxido nítrico (ON), inibição da óxido nítrico sintase (iNOS), infiltração de neutrófilos e atividade de MPO. Além disso, modula o desequilíbrio das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. O conteúdo de mucina no tecido gástrico e os níveis de PGEs também foram relatados para proteger a mucosa (ADHIKARY *et al.*, 2011a; 2011b).

A epicatequina foi avaliada a (25 e 50 mg/kg, via oral, em ratos) e apresentou ação gastroprotetora em modelos de etanol utilizando a carbenoxolona (100 mg/kg) como grupo positivo e modelo AINEs com a

cimetidina (100 mg/kg) como grupo positivo. Foi possível observar o envolvimento da participação de compostos sulfidrila (SH), via adrenérgica, canais K_{ATP}, aumento da produção de muco e diminuição da secreção de H⁺. A imunohistoquímica demonstrou o envolvimento de SOD, NO e proteína de choque térmico-70 (HSP-70) na gastroproteção (ROZZA *et al.*, 2012).

E a catequina avaliada na concentração (35 mg/kg, via oral, em ratos) promoveu aumento da atividade das enzimas antioxidantes intracelulares glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), sulfidrila total e regulação positiva de um Nrf2 no modelo de AINEs *in vivo* e *vitro* (CHENG *et al.*, 2013). O potencial antissecratório dos derivados da catequina desempenha um papel crucial na capacidade protetora contra a úlcera péptica, que é mediada pela inibição da atividade H⁺-K⁺-ATPase. A função inibitória da infecção por *H. pylori* é outro mecanismo farmacológico dos derivados de catequina para o tratamento de úlceras pépticas (MABE *et al.*, 1999; ANKOLEKAR *et al.*, 2011; DÍAZ-GOMÉZ *et al.*, 2013; PASTENE *et al.*, 2014).

Em estudos de controle de qualidade envolvendo espécies do gênero *Monteverdia*, os marcadores (+)-Catequina, (-)-Epicatequina e (-)-Epigalocatequina foram os principais metabólitos escolhidos para quantificação e monitoramento da qualidade vegetal (SOARES *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2016; SÁ *et al.*, 2017; ZANGUEU *et al.*, 2018; DUARTE, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2020). Em todos os casos, a concentração dos marcadores foi superior ao valor preconizado para a classificação do sistema *Herb MaRS* (>50µg/g).

De acordo com Spencer *et al.* (2001), há grande interesse na avaliação da biodisponibilidade de flavanóis, como catequinas da dieta e sua bioatividade *in vivo*. Os monômeros de flavanol, como epicatequina, são extensivamente metabolizados em formas O-metiladas e/ou conjugados a glicuronídeos e sulfatos durante a absorção na circulação. A clivagem de oligômeros de proantocianidinas superiores em misturas de monômero e dímero no estômago pode atuar para aumentar o potencial para sua absorção no intestino delgado, pois os oligômeros maiores têm absorção muito limitada. Ainda de acordo com os autores, as principais formas bioativas de monômeros de flavanol e proantocianidinas *in vivo* são metabólitos e/ou conjugados de epicatequina. Um

desses metabólitos, 3'-O-metilepicatequina, exerce efeitos protetores contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo.

Em estudo realizado por Auger *et al.* (2008) foram avaliadas as absorções dos flavan-3-óis no intestino delgado com monitoramento da formação de metabólitos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas no fluido ileal e urina dos pacientes. Foi possível observar que embora aproximadamente 40% da ingestão de flavan-3-ol seja recuperada no fluido ileal, quantidades substanciais são absorvidas no intestino delgado. Além disso, 14 metabólitos urinários, compreendendo sulfatos, glicuronídeos e derivados metilados, foram identificados e quantificados. Todos eram metabólitos de epicatequina ou epigalocatequina, representando 47±2% e 26±9%, respectivamente, do composto original ingerido.

Essas altas recuperações indicam que esses flavonoides absorvidos no intestino delgado são muito mais biodisponíveis do que a maioria dos flavonoides da dieta. Nenhum flavan-3-ol 3-O-galoilado ou seus metabólitos foram detectados na urina. A ausência de metabólitos flavan-3-ol urinários após a ingestão de 200 mg de galato de (-)-epigalocatequina indica que não há remoção do grupo 3-O-galloil *in vivo* e, portanto, isso não é responsável pela alta taxa urinária de recuperação de metabólitos de epigalocatequina (AUGER *et al.*, 2008).

Takami *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade crônica da administração por 90 dias de catequinas (catequina, galocatequina, epicatequina, epigalocatequina e seus derivados galoilados) em ratos F344/DuCrj, em que foi possível estabelecer o nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) de (764 mg/kg peso/dia para machos e 820 mg/kg peso/dia para fêmeas. Não foram observadas toxicidade crônica ou carcinogenicidade em ratos Wistar Hannover GALAS para os compostos acima citados, sendo possível estabelecer o NOAEL em 1922,9 mg/kg/dia em machos e 2525,7 mg/kg/dia em fêmeas (YOSHIDA *et al.*, 2011).

De acordo com os dados compilados acima, é possível constatar que os marcadores (+)-catequina, (-)-epigalocatequina e (-)-epicatequina, avaliados no presente estudo, podem ser classificados como nível 5 na escala de seleção de marcadores (*Herb MaRS*) utilizando os parâmetros propostos por Bensousson *et al.* (2015).

3.6 Validação de metodologia analítica

Os métodos analíticos desempenham um papel fundamental no cumprimento adequado dos atributos de qualidade de um determinado produto. No entanto, a qualidade adequada só é alcançada quando a metodologia analítica envolvida for submetida ao processo de validação. A validação analítica corresponde a uma ferramenta formal, sistemática e documentada que mede a capacidade de um método analítico de fornecer resultados confiáveis, precisos e reproduutíveis (ICH, 2005; BRASIL, 2017; RAO, 2018).

Nos dias atuais, estão disponíveis diversas diretrizes relacionadas à validação analítica com vistas a dirimir os problemas envolvendo a validação de metodologias para quantificação de substâncias. Entre os principais guias estão o da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017), da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2018), Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (EMA, 2016), Food and Drug Administration FDA (FDA, 2015) e do International Council for Harmonization (ICH) (ICH, 2005).

Entretanto, é comum encontrar publicações científicas contendo equívocos nos processos de validação. Problemas relacionados às peculiaridades da técnica utilizada, tipo, natureza da amostra envolvida e propósito do processo são as principais falhas relatadas (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

As diretrizes regulatórias relacionadas à validação de metodologias para avaliação de drogas e/ou medicamentos recomendam o processo de validação em quatro categorias: uso de testes de identificação (1), testes de limite de impurezas (2), testes quantitativos de impurezas (3) e testes quantitativos de ingredientes farmacêuticos ativos (4) com fins de avaliação da potência do matérias-primas ou drogas (FDA, 2015; BRASIL, 2017).

De acordo com a finalidade da metodologia analítica, diferentes parâmetros de validação podem ser requisitados como seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, intervalo, limites de detecção e quantificação e robustez. Outro ponto que deve ser levado em consideração são as exigências analíticas da agência reguladora do país em que o estudo será realizado, visto que podem haver demais obrigatoriedades a depender da legislação local (MCMILLAN, 2016).

3.6.1 Seletividade

A seletividade pode ser definida como a medida em que o método pode ser utilizado para determinar analitos específicos em misturas ou matrizes, sem que haja interferência de outros componentes com comportamento semelhante, como adjuvantes, impurezas, produtos de degradação ou outras substâncias ativas (WHO, 2018). A identidade e a pureza do marcador devem ser confirmadas, sem isso, os resultados da análise podem ser equivocados devido às possíveis contaminações ou identificações inadequadas. A simples verificação do tempo de retenção de um pico em um cromatograma da amostra em comparação com o padrão de referência, não confirmam a identidade ou pureza desta amostra, sendo recomendado em métodos cromatográficos, a utilização de detectores de arranjo de diodos (DAD), os quais escaneiam a amostra simultaneamente em diferentes comprimentos de onda revelando possíveis interferentes (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

Para sistemas cromatográficos que possuem detectores do tipo UV/VIS, aerossol carregado (DAC), espalhamento de luz evaporativo (DELE), condutividade, refração diferencial (DRD) e ionização de chama (DIF), a seletividade pode ser realizada medindo padrão e amostras em diferentes colunas, fases móveis e temperaturas. A identidade e a pureza do pico também podem ser confirmadas por adição de solução contendo substância química de referência (coeluição). Neste caso, apenas um pico deve ser obtido e a altura/área deve ser equivalente à quantidade de padrão adicionado (INDRAYANTO, 2012). A análise por detectores de espectrometria de massas CL-EM/EM e CG-EM/EM está aumentando significativamente para avaliação da seletividade de marcadores em produtos de origem natural, visto que promovem identificação específica por fragmentação dos componentes analisados (PAITHANKAR, 2013).

3.6.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é sua capacidade de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração da amostra em um determinado intervalo. Para métodos de CLAE, observa-se a relação linear entre

a resposta do detector (área e altura do pico) e a concentração da amostra. Este parâmetro pode ser avaliado por meio de uma curva analítica padrão ou por meio de uma curva analítica padrão em presença de matriz complexa. Este fator dependerá do efeito de matriz do método analítico, ou seja, se há interferência ou não dos demais compostos presentes sobre o analito desejado (KADIAN *et al.*, 2016; RAPOSO, 2016).

Alguns aspectos devem ser levados em consideração no momento da elaboração do estudo de calibração como a faixa de concentração de trabalho, a influência da matriz, o número de curvas que devem ser criadas, os níveis de calibração, a quantidade de repetições em cada nível e o tipo de calibração que será utilizada (interna/externa) (EMA, 2016; WHO, 2018).

O parâmetro linearidade deve primeiro ser avaliado por meio da inspeção visual do gráfico obtido a partir da resposta instrumental do analito (variável dependente) em relação à variação da concentração (variável independente). Isso permite a identificação de possíveis outliers, pontos de influência e tendências de dados lineares ou não lineares. No caso de uma relação linear aparente, a próxima etapa é ajustar os dados experimentais por funções de calibração e avaliação apropriada por testes estatísticos, como a regressão de mínimos quadrados e verificação da homocedasticidade dos dados (PAITHANKAR, 2013; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

Também é possível obter o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo "y", coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão e desvio padrão relativo. A condição ideal do gráfico é que ele obedeça à equação de primeira ordem do modelo linear: $y = ax + b$. O coeficiente angular (a) expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) expressa a intersecção do gráfico com os eixos. O gráfico deve apresentar perfil aleatório, randômico, mostrando que sua variabilidade é a mesma para toda a faixa de concentração avaliada na linearidade (ERMER; MILLER, 2006).

A ferramenta de regressão dos mínimos quadrados se baseia na minimização da distância entre os pontos experimentais e a linha de regressão, conhecidos como resíduos e é adequado para a maioria dos casos. Em geral, a avaliação da qualidade da linha de regressão inicia com o coeficiente de determinação (R^2); no entanto, não deve ser limitado apenas a isso. Este

coeficiente mostra a proporção pela qual a variância da variável dependente é reduzida pelo conhecimento da variável independente correspondente, ou seja, a proporção da variabilidade na resposta que é explicada pelo modelo de regressão (INDRAYANTO, 2012; RAPOSO, 2016).

De modo ideal, o valor de R^2 deve ser igual a um, mas, normalmente, valores maiores que 0,990 são considerados adequados. Embora seja um bom indicador, o coeficiente de determinação não deve ser utilizado como único parâmetro para julgar a reta de regressão obtida, pois mesmo com um alto valor, é possível observar desvios na linearidade, principalmente em regiões de baixa ou alta concentração (BONFILIO *et al.*, 2012).

Neste ponto, é importante esclarecer a diferença entre os termos de correlação e regressão, pois muitas vezes são usados indistintamente. O coeficiente de correlação (r) descreve a existência de uma relação linear entre duas variáveis observadas, e o grau de associação deve ser negativo ou positivo. Ao contrário, o coeficiente de determinação (R^2) não se preocupa com o sinal da variação e mostra o tipo de associação explicando o modelo. Portanto, r deve ser usado para indicar a força e direção de uma correlação, enquanto R^2 deve ser usado para projetar a proporção de variância explicada (RAPOSO, 2016).

Por fim, a linearidade deve ser avaliada pelo exame do gráfico de resíduos produzidos pela regressão linear. Uma avaliação visual do padrão do gráfico de resíduos é muito simples e permite uma inspeção direta da variância do erro. Homocedasticidade é o termo usado para descrever a variância constante dos erros ao longo dos diferentes níveis das concentrações. Para avaliar a homocedasticidade dos dados, duas abordagens podem ser usadas: a análise gráfica dos resíduos pela concentração em que o comportamento esperado dos dados é uma distribuição constante em torno de zero. No caso da heterocedasticidade, é possível perceber uma tendência nítida no gráfico. Os pontos serão distribuídos como um cone, com resíduos menores nos níveis inferiores e resíduos maiores nos níveis superiores (ALEXOPOULOS, 2010; MARTIN; ADANA; ASUERO, 2017; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

3.6.3 Efeito Matriz

A complexidade de determinadas amostras requer a realização do estudo de efeito de matriz. Este efeito ocorre quando há um aumento ou diminuição na resposta instrumental do analito de interesse devido à interferência de um ou mais componentes da amostra. As avaliações dos efeitos da matriz envolvem a comparação da curva de calibração obtida com a matriz fortificada com uma curva de calibração obtida com o solvente (BRASIL, 2017; FDA, 2015). As curvas devem ser estabelecidas em triplicatas e nos mesmos níveis de linearidade (EMA, 2011).

Ao comparar os coeficientes de inclinação das retas obtidas, pode-se avaliar o paralelismo das linhas. A presença de paralelismo é indicativa da ausência do efeito de matriz, e sua demonstração deve ser realizada por meio de uma avaliação estatística adequada, por exemplo, pelos testes F (Fisher-Snedecor) e teste *t* (Student), adotando-se um nível de significância de 5%. No entanto, um conjunto adequado de dados deve ser obtido para permitir a determinação adequada da variância dos valores a serem comparados (HUANG *et al.*, 2012; ZHOU; YANG; WANG, 2017; LUCA *et al.*, 2020).

3.6.4 Precisão

O parâmetro precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Divide-se em três categorias: repetibilidade ou precisão intra-corrida; precisão intermediária ou inter-corrida e reproduzibilidade ou precisão inter-laboratorial (FDA, 2015; BRASIL, 2017).

Os resultados analíticos são influenciados por erros sistemáticos (determinados) e aleatórios (indeterminados). Os erros sistemáticos são causados por problemas que persistem ao longo de todo o experimento e podem ser erros metodológicos, instrumentais ou pessoais. Tais erros são repetíveis em um conjunto de medições, desviando os resultados experimentais da direção do valor verdadeiro. Por outro lado, os erros aleatórios são inconsistentes e irrepetíveis, causados por variáveis incontroláveis ou desconhecidas que levam à dispersão dos dados. Esses erros não podem ser corrigidos ou excluídos, caracterizando a precisão do método analítico (MCMILLAN, 2016; RAO, 2018).

A precisão deve ser avaliada para testes e ensaios que busquem determinações quantitativas, e é geralmente expressa como o coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (DPR), que é a razão entre o desvio padrão e a média, multiplicado por 100. Em indústria farmacêutica, para garantir a precisão do método para os analitos principais, o DPR normalmente adotado deve ser $\leq 2\%$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; ERMER; MILLER, 2006). Entretanto, de acordo com os guias para validação analítica, valores de DPR $< 5\%$ são recomendáveis (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.6.4.1 Repetibilidade ou precisão intra-corrida

A repetibilidade reflete a concordância entre os valores obtidos por meio de medições sucessivas nas mesmas condições operacionais e do mesmo analista em um curto período de tempo. Este ensaio avalia a contribuição do preparo da amostra para a variabilidade do método e pode ser influenciada pela diluição, pesagem, homogeneização e extração. Este termo é considerado sinônimo de precisão intradiária e difere da precisão instrumental (THEODORSSON, 2012; BELOUAFA *et al.*, 2017).

As amostras devem ser preparadas independentemente do início do procedimento analítico e, para as mesmas amostras sólidas e semissólidas, a mesma solução estoque não pode ser usada. A repetibilidade pode ser determinada realizando um mínimo de seis repetições preparadas individualmente a 100% da concentração de teste, ou nove determinações devem ser usadas com três níveis de concentração diferentes (baixo, médio e alto) preparados em triplicado e cobrindo a faixa especificada para o procedimento (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

3.6.4.2 Precisão intermediária ou precisão inter-análise

A precisão intermediária expressa o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos como dias, analistas e equipamentos diferentes, ou uma combinação desses fatores, a fim de refletir a variabilidade laboratorial de rotina esperada. Inclui a influência de efeitos aleatórios adicionais de acordo com o uso pretendido do método no mesmo laboratório e pode ser considerada como uma estimativa da variabilidade de longo prazo. Além disso, tal avaliação verifica

a capacidade do procedimento de fornecer os mesmos resultados, visto que em diferentes execuções analíticas podem ocorrer alterações nos lotes de reagentes ou fornecedores, bem como variações nos padrões de calibração, recalibração dos equipamentos e alterações nas temperaturas (EMA, 2011; KANDIAN *et al.*, 2016; WHO, 2018).

Este ensaio também é conhecido como precisão inter-ensaio e pode ser determinado através da análise de amostras semelhantes em dias diferentes, com analistas e instrumentos diferentes (FDA, 2015). O número necessário de determinações e níveis testados para avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação de repetibilidade e também pode ser expressa pelo DPR. Além disso, o planejamento e a execução devem incluir a mesma abordagem em termos de níveis de concentração e o mesmo número de determinações realizadas anteriormente (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com diferentes analistas (BRASIL, 2017).

Em primeiro lugar, o DPR para as duas séries de análises (repetibilidade e testes de precisão intermediária) deve ser calculado para uma abordagem adequada deste teste. Em sequência, os resultados obtidos nos resultados das duas séries (média \pm DP) devem ser estatisticamente equivalentes via teste t (INMETRO, 2016). Este teste estatístico é usado para verificar se as médias dos resultados dos dois grupos podem ser consideradas estatisticamente iguais. No entanto, às vezes as duas séries de medições podem diferir significativamente por esse teste estatístico. Isso é particularmente frequente no caso de boas medições de desempenho nas quais os dois conjuntos mostram pouca dispersão. Se ao nível de significância adotado não houver diferença significativa entre as médias, considera-se que o método possui precisão intermediária adequada.

3.6.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O LD pode ser estimado por três critérios diferentes: avaliação visual,

relação sinal-ruído (S/R) e com base em parâmetros da curva analítica. (FDA, 2015; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017, WHO, 2018).

O método visual é empregado para analisar amostras com concentrações conhecidas e decrescentes do analito. Assim, o LD está associado à concentração mais baixa na qual o ruído e o sinal analítico são distinguíveis. Este método foi inicialmente projetado para análise qualitativa, onde o resultado é expresso como positivo (analito é detectado) ou negativo (analito não é detectado) (KRUVE *et al.*, 2015).

A segunda abordagem utilizada é por meio do cálculo da razão sinal-ruído, onde é feita uma comparação da medição do sinal do analito na matriz com uma amostra em branco (matriz sem o analito). A concentração correspondente ao LD é a concentração do composto com uma relação sinal-ruído de 3:1 (EMA, 2006; RAVISANKAR *et al.*, 2015; WHO, 2018). Na literatura, esta abordagem é a mais popular entre analistas que conduzem estudos de validação. No entanto, a razão pode estar sujeita à subjetividade (ERMER; MILLER, 2006). De acordo com o ICH (2005), quando o LD é estimado por essas duas abordagens descritas acima, é importante apresentar os dados no relatório analítico.

E a terceira forma de avaliação é baseada nos parâmetros da curva analítica. Esta abordagem pode estar exposta a erros se a faixa de concentração não for adequadamente limitada, apesar de ser considerada o critério de avaliação mais robusto (ERMER; MILLER, 2006; RAPOSO, 2016). O LD é calculado pela seguinte equação: $LD = 3 \times \text{desvio padrão do intercepto/inclinação da reta}$ (BRASIL, 2017).

É importante salientar que a concordância entre os valores teórico e prático dos limites de detecção e de quantificação variam de acordo com o sistema cromatográfico empregado, da condição das lâmpadas do detector, fontes de ruído eletrônico e concentração da solução em análise. Quanto menor for a concentração do analito, menor será o grau de concordância entre os valores teóricos e práticos (INMETRO, 2016; BELOUAFA *et al.*, 2017).

3.6.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada. A fidelidade,

na prática, é aceita como um DPR de até 10% e uma exatidão de \pm 10%. Pode também ser definida utilizando-se a relação sinal/ruído com o branco como referência. Valores próximos a dez vezes o desvio padrão do ruído medido utilizando-se o branco também são aceitos (GUPTA *et al.*, 2012). Porém, devido à limitação da relação S/R em algumas técnicas analíticas, a abordagem mais sugerida é o cálculo através dos parâmetros da curva analítica, utilizando a equação: $LD = 10 \times \text{desvio padrão do intercepto/inclinação da reta}$ (BRASIL, 2017)

O cálculo teórico deve ser utilizado como ponto de partida para realizar o teste prático LQ do método, pois o método pode não ser efetivamente capaz de quantificar as concentrações calculadas de analito. Assim, devem-se preparar soluções diluídas com concentração equivalente à calculada. Estas soluções devem ser analisadas e injetadas sequencialmente pelo menos seis vezes. Todos os cromatogramas devem ser analisados e a resposta das injeções deve ser avaliada quanto à sua exatidão e precisão e se os valores da relação sinal/ruído são próximos aos esperados. Se o resultado obtido demonstrar exatidão e precisão adequada e tiver valor próximo ao esperado de relação sinal/ruído, então esta solução é correspondente ao LQ do método. Caso contrário, deve-se realizar nova diluição com concentração maior ou menor de analito, até que sejam obtidos valores adequados. (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014; INMETRO, 2016).

3.6.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a concordância entre o valor aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência e o valor encontrado experimentalmente. Devido ao fato de quase nenhum processo de medição ser ideal, o valor verdadeiro ou real não pode ser exatamente conhecido em qualquer medição particular. O valor verdadeiro aceito para avaliação da exatidão pode ser obtido através da análise de uma amostra com concentração conhecida (ICH, 2005; GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

Os estudos de exatidão são geralmente realizados através da determinação da recuperação da amostra enriquecida de analito na matriz da amostra ou comparando o resultado obtido com os valores de um material de

referência certificado e de pureza conhecida. Se o placebo da amostra não estiver disponível, a técnica de adição padrão é a mais recomendada. Este parâmetro deve ser avaliado usando um mínimo de nove determinações ao longo de pelo menos três níveis de concentração cobrindo a faixa de trabalho especificada (KADIAN *et al.*, 2016; BRASIL, 2017; WHO, 2018).

Os resultados da exatidão devem ser expressos como porcentagem de recuperação pelo ensaio da quantidade adicionada conhecida de analito na amostra ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro aceito juntamente com os intervalos de confiança. A concentração deve cobrir a faixa de trabalho. A recuperação esperada depende da matriz da amostra, do procedimento de processamento da amostra e da concentração do analito (BETZ *et al.*, 2012; McMILLER, 2016; RAO, 2018).

3.6.8 Robustez

É a medida da capacidade de um método resistir à pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (FDA, 2015; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017, WHO, 2018). A robustez permite avaliar a confiabilidade do método em condições normais de operação, possibilitando estabelecer as faixas de tolerância do método. Durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica, é importante considerar a avaliação da robustez, e caso seja constatado que o método é suscetível às variações nas condições analíticas, estas devem ser controladas e medidas de precaução que serão ser incluídas no procedimento (INDRAYANTO, 2012).

A influência dos fatores pode ser avaliada individualmente ou com vários fatores sendo alterados simultaneamente, sendo que no segundo caso é recomendável que se realize planejamento fatorial para posterior análise através de gráficos de superfície de resposta. O INMETRO (2016) recomenda que se utilize o teste de Youden para se determinar a robustez de um método, pois além de avaliar a robustez do mesmo, as influências são ordenadas nos resultados finais, indicando o tipo de influência de cada uma das variações realizadas (AOAC, 2013; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

No caso da cromatografia, diversos parâmetros experimentais podem ser modificados, porém devem estar dentro de uma faixa realista e a variação de

resposta deve ser conhecida. Assim, pode-se especificar a faixa de tolerância para cada parâmetro do método dentro do qual ele é considerado robusto. Quando a robustez é validada com mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação sem haver alterações significativas nos resultados, pode-se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (ERMER; MILLER, 2006; GUPTA *et al.*, 2012).

Não existe uma regra que descreva quais parâmetros devem ser avaliados na análise de robustez. Eles devem ser determinados pelo analista e serão diferentes de acordo com os diferentes equipamentos e técnicas aplicadas. Algumas sugestões de quais parâmetros escolher são exibidos na Tabela 3.

Tabela 3. Fatores potenciais a serem examinados durante os testes de robustez.

Técnica analítica	Fatores
Cromatografia líquida (CL)	Proporção de constituintes da fase móvel; pH da fase móvel; Concentração de tampão; Fluxo de fase móvel; Temperatura da coluna; Eluição de gradiente - fase móvel inicial; Inclinação do gradiente; Fase estacionária; Fabricante de coluna; Comprimento de onda de detecção.
Cromatografia gasosa (CG)	Tipo de coluna; Temperatura do injetor; Temperatura da coluna; Temperatura do detector; Temperatura inicial e final; Inclinação do gradiente de temperatura; Tipo / composição do gás de arraste; Fluxo de gás; Condições de divisão ou sem divisão; Fluxo dividido; Tipo de revestimento; Fabricante de coluna; Fase estacionária da coluna.
Cromatografia em camada delgada (CCD)	Composição de eluente; pH da fase móvel; Temperatura; Distância de desenvolvimento; Forma de aplicação; Tamanho do ponto; Lote de placas; Volume de amostra; Condições de secagem (temperatura, tempo).
Eletroforese capilar (EC)	Concentração de eletrólito; pH do tampão; Concentração de aditivos; Temperatura; Tensão aplicada; Tempo de injeção de amostra; Concentração de amostra; Tempos de enxágue; Comprimento de onda de detecção.

Fonte: Adaptado de VANDER HEYDEN *et al.*, 2001; DEJAEGHER; VANDER HEYDEN, 2009; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; MARSON *et al.*, 2020.

3.6.9 System suitability

Por meio de ensaios experimentais e evidências científicas, a validação do método garante que o procedimento analítico seja adequado para o uso pretendido nas condições especificadas. Mesmo assim, pode não ser adequado garantir que a qualidade dos resultados gerados por qualquer método analítico, quando aplicados na rotina diária, serão sempre precisas devido a uma validação analítica realizada em um equipamento qualificado (ICH, 2005; FDA, 2015).

Alguns aspectos podem influenciar a qualidade destes resultados, uma vez que qualquer procedimento é suscetível a eventuais desvios que podem levar a erros sistêmicos ou aumento do erro aleatório. Uma vez que o equipamento passa pela qualificação, é seguro dizer que os componentes do equipamento são capazes de fornecer resultados confiáveis. Porém, durante as atividades laboratoriais, o equipamento pode estar sujeito à perda de eficiência ou mau funcionamento. A etapa que mede essa adequação é chamada de testes de adequação do sistema ou *system suitability* (SSTs), e essa verificação é realizada antes ou em paralelo a qualquer corrida analítica no dia a dia do laboratório, visando garantir que o sistema está adequado, ratificando que suas funções estão dentro de limites predefinidos no momento de uso (PAITHANKAR, 2013).

Embora seja recomendada uma avaliação abrangente de todo o processo, o SST frequentemente se traduz na verificação de equipamentos analíticos. Aspectos relacionados à preparação da amostra, validação analítica e qualificação do equipamento também são passíveis de verificação. Os parâmetros de SST para análise em cromatografia líquida podem incluir resolução (R_s), número de pratos teóricas (N), fator de cauda (T), fator de capacidade (k), entre outros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP, 2018).

A adequabilidade do sistema pode ser abordada de dois modos diferentes. O primeiro, considera que a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico devam estar adequadas para a análise ser realizada. Assim, a este parâmetro é avaliado durante o desenvolvimento e validação do método. Os critérios selecionados são baseados no desempenho da metodologia e são determinados durante a validação. O segundo modo considera o sistema como um todo e inclui o sistema cromatográfico, calibração e manutenção dos

equipamentos e instrumentos utilizados em todo o procedimento analítico, dentro das especificações. Assim, a adequabilidade baseia-se no princípio de que o equipamento, os componentes eletrônicos, as operações analíticas e as amostras constituem um sistema integral que deve ser avaliado como um todo. A adequabilidade do sistema compreenderá, portanto, em uma verificação do sistema inteiro para garantir a sua qualidade antes ou durante a análise de amostras desconhecidas (ERMER; MILLER, 2006; EPHSTEIN, 2020).

3.7 Sazonalidade

A composição química das espécies vegetais pode ser afetada por uma gama de fatores que interferem em sua biossíntese e concentração ao longo do desenvolvimento da planta (ESTELL; FREDRICKSON; JAMES, 2016). As proporções relativas de metabólitos secundários nestas plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter - e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (ZHI-LIN; CHUAN-CHAO; LIAN-QING, 2007; BARTON; KORICHEVA, 2010; MOORE *et al.*, 2014).

Os principais fatores que interferem na biossíntese e, consequentemente, ocasionam uma variabilidade no conteúdo total, bem como nas proporções relativas dos compostos químicos de diferentes espécies vegetais, podem ser classificados em abióticos tais como sazonalidade, temperatura, índice de precipitação, épocas de colheita, ritmo circadiano, altitude, ventos fortes, composição do solo, radiação UV, intensidade de luz, entre outros (GOUINGUENÉ; TURLINGS, 2002; AKULA; RAVISHANKAR, 2011; GOUVEA *et al.*, 2012; ARMENGOL, 2015; MARCHIORO; FOERSTER, 2016) e bióticos como ataque de patógenos, abundância de polinizadores, dispersores, predadores e herbivoria (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ACHAKZAI *et al.*, 2009; RADUŠIENĖ; KARPAVIČIENĖ; STANIUS, 2012; WOJAKOWSKA *et al.*, 2013; AUSTEN *et al.*, 2019; ISAH, 2019). As variações observadas apresentam grande importância, pois são substâncias com significado quimiotaxonômico, biossistêmático, fisiológico, ecológico, evolutivo, além de importantes propriedades terapêuticas (SZAKIEL; PĄCZKOWSKI; HENRY, 2010).

Para enfrentar a influência dos fatores bióticos e abióticos, as espécies vegetais promovem o acúmulo de metabólitos para proteção da membrana plasmática e modificam o desenvolvimento fenológico evitando que algum fator estressante provoque danos fisiológicos (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; GULL; LONE; WANI, 2019). A resistência à seca é um mecanismo que permite à planta manter o seu metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos, devido ao acúmulo de solutos compatíveis (MEDEIROS *et al.*, 2012; GERSHENZON; ENGELBERTH, 2013; BASU *et al.*, 2016). Esses solutos podem manter o fechamento dos estômatos para evitar a perda de água por transpiração ou por vias não estomáticas das células em ambientes muito secos, sendo importantes para a tolerância das plantas a ambientes estressantes (PIRASTEH-ANOSHEH *et al.*, 2016). Entretanto, em situações severas com baixo índice pluviométrico, podem interferir na produção dos metabólitos mais complexos do metabolismo secundário para manutenção do metabolismo primário (YANG *et al.*, 2018).

A época de colheita é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (LLUISA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2019). A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (DE-LA-CRUZ CHACÓN; RILEY-SALDAÑA; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2013; GONZÁLEZ-VILLAGRA *et al.*, 2018).

As diferenças ambientais a que são submetidos os indivíduos de uma mesma espécie podem estimular a disparidade entre os conteúdos de determinadas classes de metabólitos secundários (YANG *et al.*, 2011; RADUŠIENĖ; KARPAVIČIENĖ; STANIUS, 2012), assim como em seus estágios vegetativo e reprodutivo (LEISSO; DAVE; MARK, 2018). O período de ocorrência, intensidade e duração das fenofases de floração e frutificação são irregulares, variando entre espécimes e dentro de um mesmo indivíduo. Essa variação é ocasionada devido à interação de fatores abióticos e bióticos (CRISTIANS; MATA; BYE, 2014). Neste sentido, os metabólitos secundários

representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar da capacidade de adaptação individual de cada espécie ao seu habitat, as plantas, normalmente, são capazes de existir em uma determinada faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários (YANG *et al.*, 2011; SHAMLOO *et al.*, 2017).

As necessidades relacionadas à intensidade luminosa e suas proporções variam muito em plantas. Diferentes espécies estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade de incidência luminosa (WATERMAN; MOLE, 1994). Além disso, existe uma crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação ultravioleta (UV-B, 280–320nm) decorrente da destruição da camada de ozônio. Acerca deste fato, diversos trabalhos correlacionam a produção de compostos fenólicos como flavonoides, taninos e antocianinas em resposta à maior radiação solar. Isso pode ser explicado, pela proteção contra fotodestruição e redução de espécies reativas de oxigênio fornecidas por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim o dano causado pela radiação UV-B nos tecidos mais profundos (BABENKO *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2020).

Entretanto, este fator abiótico também pode interferir na produção de outras classes de metabólitos como terpenoides (MIAO *et al.*, 2020), alcaloides (LYDON *et al.*, 2009), antraquinonas (WANG; YANG; LI, 2010), glicosídeos cianogênicos (KATEROVA *et al.*, 2012), entre outros (ZHANG; BJÖRN, 2009).

A composição do solo e seus nutrientes interferem diretamente no metabolismo primário dos vegetais, entretanto também é possível observar que influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários (JURIC *et al.*, 2020). Estes efeitos, não são totalmente previsíveis e tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível ditar regras estáveis (WATERMAN; MOLE, 1994). Entre todos os nutrientes disponíveis para enriquecimento do solo, destacam-se os efeitos do nitrogênio (IBRAHIM *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2019; RADUŠIENĖ *et al.*, 2019).

Outro fator que pode exercer efeitos sobre o desenvolvimento e produção dos metabólitos secundários é a altitude. Estudos apontam um aumento na

produção de flavonoides e correlação pode ser explicada, em parte, pela maior suscetibilidade à radiação UV em maiores altitudes, visto que estes metabólitos são reconhecidos por propiciar proteção à radiação e seus efeitos (SPITALER *et al.*, 2006; ZIDORN, 2010). Metabólitos não fenólicos também podem ser influenciados pela altitude (GOBBO-NETO *et al.*, 2017; ADHIKARI *et al.*, 2020; RANA; SAKLANI; CHANDEL, 2020).

Neste sentido, torna-se relevante a análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Considerando a ampla possibilidade de fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, são importantes estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos. Além disso, o reconhecimento e a compreensão dessas variações poderão auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

3.8 Análise multivariada

A análise de dados multivariados surgiu devido à necessidade do tratamento de dados de psicometria. Entretanto seu desenvolvimento significativo ocorreu após o desenvolvimento de sistemas computacionais mais avançados que permitiram a melhor aplicabilidade de metodologias. Neste panorama, surgiu a quimiometria, que é considerada uma área da química destinada à análise de dados de natureza multivariada (QUEIROZ; MELO; JARDIM, 2002). Empregada na química analítica a partir da década de 1970 em decorrência dos progressos na instrumentação e nos processadores de dados (NETO; SCARMINIO; BRUNO, 2006).

Conforme definido oficialmente, a quimiometria é uma disciplina química que usa matemática, estatística e lógica formal para projetar ou selecionar procedimentos experimentais ideais, fornecer as informações químicas mais relevantes por analisar dados químicos e obter conhecimentos sobre sistemas químicos. As aplicações típicas de métodos quimiométricos são o desenvolvimento de relações estrutura-atividade quantitativa ou a avaliação de analítica dados químicos (ONJIA, 2016).

Como exemplos de sua aplicabilidade em estudos das espécies do gênero *Monteverdia*, Beltrame *et al.* (2012), verificaram a diferença existente entre diversas amostras comerciais de *M. ilicifolia* por avaliação das semelhanças e diferenças entre as mesmas e a amostra padrão, utilizando uma abordagem quimiométrica, visto que a abordagem tradicional seria inviável pela quantidade de dados gerados. Estas ferramentas também podem ser utilizadas para realizar a diferenciação de espécies vegetais nativas e seus híbridos, conforme observado por Antunes *et al.* (2020) ao confirmar as disparidades existentes entre as espécies *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e uma variante híbrida utilizando a metabolômica associada à quimiometria.

3.8.1 Análise exploratória de dados

O principal objetivo de uma análise exploratória é extrair o máximo de informações dos dados experimentais, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. Os objetos químicos típicos são as amostras analíticas ou compostos químicos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, tais como a concentração, a intensidade das bandas em perfis cromatográficos, comprimento de onda em perfis espectroscópicos, entre outros (CORDELLA, 2012).

A análise exploratória dos dados é empregada para a determinação de relações gerais entre dados, associando as amostras que apresentem características semelhantes. Esta técnica também auxilia na identificação de amostras que não seguem o padrão da maioria (GHOSH *et al.*, 2018). Os métodos multivariados de análise de dados podem ser divididos em dois grupos: a aprendizagem não supervisionada e a aprendizagem supervisionada. Na aprendizagem não supervisionada o objetivo é encontrar agrupamentos naturais das amostras num espaço bidimensional. Os métodos mais utilizados são a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Já na aprendizagem supervisionada o objetivo é desenvolver modelos baseados nas informações da origem das amostras, para que estas sejam classificadas corretamente e então aplicar esta regra para amostras de origem desconhecidas visando sua classificação (BANSAL *et al.*, 2014). Um

método muito utilizado para modelagem é o modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA) (TRIBA *et al.*, 2015).

3.8.1.1 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA é o fundamento principal de vários métodos de análise multivariada e tem como objetivo, reduzir a dimensão dos dados originais, favorecendo a visualização das informações mais significantes em um número menor de fatores, ou componentes principais (PC). Desta forma, as principais vantagens da PCA estão na simplificação, modelagem, detecção de amostras anômalas, classificação e previsão (TRIVEDI; ILES, 2012; SANTOS *et al.*, 2019).

A escolha do número de componentes principais que serão utilizadas na descrição do sistema, permitem reduzir a dimensão dos dados e consequentemente, melhorar a análise. A seleção permite descrever valores superiores a 90% da variância dos dados com um número reduzido de fatores em relação às variáveis originais e pode ser feita levando-se em consideração a porcentagem de variância descrita pelas PC's e a variância residual (JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

O primeiro componente principal (PC1) consiste na combinação linear de máxima variância das variáveis originais, ou seja, os auto vetores, em um determinado eixo. Já o segundo componente (PC2), de segunda maior variância, é ortogonal ao (PC1) e não correlacionado a ele. O terceiro apresenta maior variância e é ortogonal aos dois primeiros PC, não correlacionados. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, a informação relevante fica concentrada nos dois ou três primeiros PCs, que podem ser então confrontados com padrões de características conhecidas (TRIVEDI; ILES, 2012; ONJIA, 2016).

Novos conjuntos de dados derivam dos (PC's), são os chamados *scores* e *loadings*. Os *scores* fornecem a composição dos componentes principais em relação aos objetos (amostras), enquanto os *loadings* fornecem a mesma composição relacionada às variáveis. Como são ortogonais, é possível examinar as relações entre os objetos através dos gráficos de *scores* projetados nos primeiros (PC's), e entre as variáveis, através dos gráficos de *loadings* (LILAND *et al.*, 2011; BANSAL *et al.*; 2014).

Os componentes principais são obtidos por meio de transformações lineares conforme a equação: $XP = T$, em que X corresponde à matriz original dos dados; T, a matriz de escores que contêm as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos; e P, a matriz dos pesos (*loadings*) onde os elementos de cada coluna correspondem aos coeficientes das combinações lineares das variáveis originais (JOLLIFFE; CADIMA, 2016).

Devido à variedade de resultados e tipos de amostras utilizados, os dados originais podem não ter uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Nestes casos, antes de se aplicar a PCA a dados numéricos, é imprescindível que seja realizado um pré-processamento nos dados originais. Os principais tipos de pré-processamento são o Centrado na média – CM e o Autoescalonamento – AS (KOVACEVIC; SIMPSON, 2020). No primeiro, é calculada a média dos valores experimentais para cada variável e, em seguida, são reduzidos os valores experimentais do respectivo valor médio. O processo de autoescalonamento centraliza os dados na média e divide-os pelo seu desvio-padrão, correspondente a cada variável (LYRA *et al.*, 2010).

3.8.1.2 Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (HCA)

A ferramenta Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA), é utilizada em análises exploratórias dos dados com o intuito de identificar possíveis agrupamentos e o valor provável do número de grupos ou classes com base nas características e nas relações entre elas (GLASSEY, 2013; SINGH *et al.*, 2013). É uma técnica que se baseia em uma medida de proximidade entre as amostras a serem agrupadas, normalmente expressa como uma função da distância entre os dados. Essas podem ser medidas de similaridade ou dissimilaridade (DUMANČIĆ; BLOCKEEL, 2017).

As análises deste tipo podem ser utilizadas para duas finalidades como a simplificação de dados, visto que a capacidade de analisar grupos semelhantes é maior que as avaliações individuais; e a identificação de relação por meio da estrutura simplificada da análise de agrupamentos, que retrata vínculo entre as variáveis não reveladas de outra forma. Em termos práticos, as variáveis serão divididas em grupos de forma que os elementos pertencentes a um mesmo grupo

sejam similares entre si em relação às características que para as quais foram avaliadas. Ademais, espera-se que os elementos de grupos diferentes sejam heterogêneos (ou dissimilares) em relação a essas mesmas características (SANTCHURN *et al.*, 2012; TULLIS; ALBERT, 2013).

A medida de similaridade é fundamental na análise de agrupamentos, pois é um indicador empírico de semelhança e correspondência entre as variáveis. A mais utilizada é a da distância, que representa similaridade como proximidade de observações umas com as outras. Nesse caso, a distância é convertida em uma medida de similaridade pelo uso de uma relação inversa, ou seja, valores maiores denotam menor similaridade e vice-versa. Diversas medidas de distância são utilizadas, cada uma com características específicas, tais como, distância euclidiana, city-block, Chebyshev, Mahalanobis, entre outras. Dentre as citadas, a euclidiana é mais utilizada. Essencialmente, é uma medida do comprimento de um segmento de reta desenhado entre dois objetos, quando representados graficamente (KUMAR; CHHABRA; KUMAR, 2014; ONJIA, 2016).

Os procedimentos hierárquicos de agrupamentos (tipo árvore) são os tipos de estruturas mais utilizadas e podem ser aglomerativos ou divisivos. Nos aglomerativos, utiliza-se o dendograma que é um tipo específico de diagrama que organiza determinadas variáveis depois de uma análise estatística de dados. Emprega-se um método quantitativo, que leva a agrupamentos e a sua ordenação hierárquica ascendente, que em termos gráficos se assemelha aos ramos de uma árvore, que se dividem em outros sucessivamente. Nele estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade, que agruparam pares de amostras (SASIREKHA; BABY, 2013; DUMANČIĆ; BLOCKEEL, 2017).

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

similaridade é definida entre agrupamentos de múltiplos membros, ou seja, é a forma de medir a distância entre as variáveis nos agrupamentos.

Métricas angulares, como ρ , possuem a vantagem de serem independentes da escala dos vetores envolvidos. Após a definição da métrica, para a execução da HCA deve ser escolhido ainda o critério de ligação entre amostras, sendo os mais utilizados os seguintes (SANTOS *et al.*, 2013): ligação simples (conhecido também como critério do vizinho mais próximo); ligação completa (conhecido também como critério do vizinho mais distante); ligação média e critério de Ward. A ligação média pode ser definida de diferentes maneiras tais como: método de grupo por par ponderado com média aritmética (WPGMA, do inglês *weighted pair group method with arithmetic mean*), método de grupo por par não ponderado com média aritmética (UPGMA, do inglês *unweighted pair group method with arithmetic mean*), método centroide por par não ponderado (UPGMC, do inglês *unweighted pair group method with centroid mean*) e método centroide por par ponderado (WPGMC, do inglês *weighted pair group method with centroid mean*) (MÜLLNER, 2011).

O método de ligação média (UPGMA) utiliza a média das distâncias entre todos os pares de amostras de um agrupamento e do outro para a formação de cada grupo. É um método de agrupamento não-ponderado, que utiliza médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterizá-las por valores extremos (máximo e mínimo), por isso, muitos pesquisadores consideram-no o mais apropriado para inúmeras aplicações (HAIR *et al.*, 2009; SANTCHURN *et al.*, 2012; PROTÁSIO *et al.*, 2013; ONJIA, 2016).

3.9 Desreplicação

O controle de qualidade se constitui como uma etapa essencial para que uma espécie vegetal possa ser utilizada com segurança como produto tradicional ou fitoterápico. Contudo, as ervas medicinais são comumente comercializadas sem discriminação das diferentes partes da planta, ou como uma mistura de diferentes espécies. Em alguns casos, podem apresentar centenas ou até alguns milhares de componentes. Muitas vezes os compostos responsáveis pela atividade são desconhecidos, o que dificulta significativamente um controle de qualidade eficaz (KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012; FORIM *et al.*, 2015).

Devido à grande complexidade dos produtos de origem vegetal, pequenas diferenças em substâncias fortemente relacionadas à atividade podem não ser facilmente visualizadas, mesmo assim, afetam significativamente o resultado obtido para o paciente após sua utilização. Esse obstáculo vem sendo superado através do desenvolvimento de técnicas analíticas e ferramentas estatísticas para tratamento de dados que possibilitam identificar uma ampla variedade de substâncias em misturas complexas e detectar variáveis que influenciam significativamente as atividades farmacológicas (LIU *et al.*, 2016; BEGOU *et al.*, 2018; CAESAR; CECH, 2019).

O termo desreplicação, derivado do inglês *dereplication*, consiste em uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos ou amostras complexas, objetivando o descobrimento de substâncias inéditas presentes nesses extratos, de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de uma substância já conhecida ou estabelecer perfis químicos mais detalhados de espécies vegetais favorecendo o seu controle de qualidade (ALLARD *et al.*, 2016; PARRA, 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método que permite a separação adequada de misturas complexas, contendo substâncias com diferentes polaridades, tamanhos e funcionalidades químicas, como os extratos brutos de origem vegetal. O seu uso associado a detectores por arranjo de diodos (CLAE-DAD) permite a obtenção dos espectros de absorção na região do UV para a maioria das substâncias separadas durante o processo cromatográfico (CHATTERJEE; KUMAR; CHATTOPADHYAY, 2013). Dezenas de metabólitos podem ser detectados nos extratos brutos e os perfis gerados podem ser comparados entre diferentes amostras. As informações sobre os tempos de retenção e os espectros de absorção UV são empregadas para o reconhecimento de substâncias ou de prováveis análogos, por meio de comparações com amostras padrão (ARJUN; VINCENT; KANNAN, 2016; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017).

O uso da CLAE acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-DAD-EM) ampliou as possibilidades de caracterização e identificação de metabólitos. Nesse processo, o eluente contendo as substâncias separadas pela coluna é direcionado à câmara de ionização do espectrômetro de massas. Métodos ‘brandos’ de ionização a pressão atmosférica são usados para a

geração de íons estáveis e adutos, a partir dos metabólitos que adentram a câmara de ionização. O método de ionização a pressão atmosférica mais empregado é o electrospray (ESI). Os íons são detectados por analisadores de massas como quadrupolo, tempo de vôo e ion trap (SASHIDHARA; ROSAIAH, 2007). A combinação entre a ionização por electrospray e analisador por tempo de vôo (ESI-TOF) nos sistemas de CLAE-DAD-EM são bastante comuns (SMYTH *et al.*, 2012).

O uso de CLAE-DAD-EM permite agregar informações sobre a massa acurada dos metabólitos presentes nos extratos brutos. Os dados de massa de alta resolução e o padrão de adutos formados durante a análise, como $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, são usados para calcular a provável fórmula molecular dos metabólitos de interesse (KIND; FIEHN, 2010). Os resultados obtidos são usados na busca por substâncias já conhecidas, contendo a mesma composição química dos metabólitos detectados, em bancos de dados especializados ou construídos pelos próprios pesquisadores. Os dados de espectroscopia na região do UV, tempo de retenção e a identidade do organismo produtor são comparados com aqueles dos possíveis candidatos presentes no banco de dados, permitindo a identificação, mesmo que por tentativa, de metabólitos conhecidos (ALLARD *et al.*, 2016; DE VIJLDER *et al.*, 2018).

Uma ferramenta útil para desreplicação de extratos vegetais e que tem crescido na química de produtos naturais nos últimos anos, principalmente pelas diversas aplicações, é a molecular network (ATANASOV *et al.*, 2021). Esta abordagem fornece uma nova maneira de percorrer o metaboloma da amostra biológica, uma vez que é possível observar analogias entre os metabólitos identificados (WOLFENDER *et al.*, 2019).

A desreplicação de amostras complexas de origem vegetal aliada ao emprego de técnicas hifenadas como a CLAE-EM/EM se configuram como ferramentas que podem ser aplicadas na identificação de metabólitos presentes nos extratos vegetais. Além de representar ganho de tempo nas investigações dos extratos, possibilita o não isolamento de compostos conhecidos, otimiza a busca por compostos inéditos, reduz custos e potencializa a análise de controle de qualidade das espécies em estudo.

PARTE EXPERIMENTAL

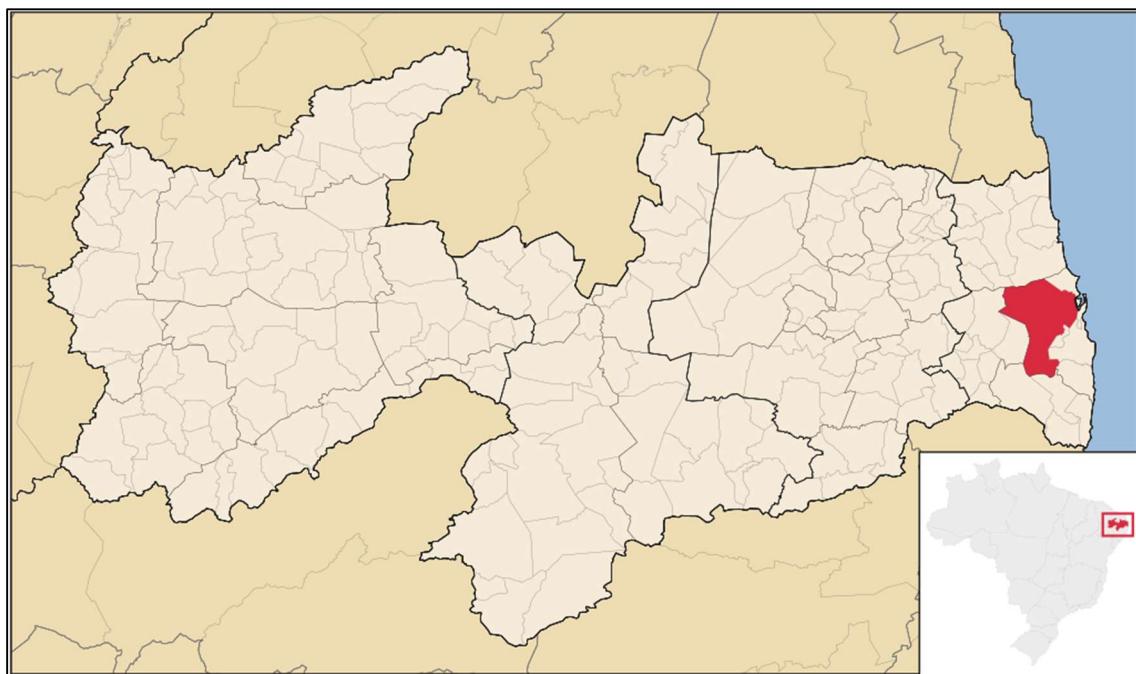
4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Botânico

O material vegetal utilizado da espécie *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral foi coletado no município de Santa Rita, localizado na região litorânea do estado da Paraíba, nos meses de janeiro a dezembro de 2017 e identificado pela botânica Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário JPB/UFPB (coleção de M. F. Agra *et al.*, 3230).

O município de Santa Rita apresenta temperatura média anual de 25,6°C (21,6 – 29,6°C), índice pluviométrico de 1590 mm e altitude média de 15-20 m do nível do mar (Figura 13) (AESÁ, 2017; CLIMATE-DATA, 2017). A região de coleta está destacada em verde (Figura 14).

Figura 13. Mapa do Estado da Paraíba com destaque para o município de Santa Rita-PB.



Fonte: Google Maps.

Os dados de coleta do material vegetal de janeiro a dezembro de 2017 estão descritos na Tabela 4. E o índice pluviométrico anual médio, assim como o índice registrado no período das coletas estão dispostos na Tabela 5 e foram

plotados no Gráfico 1. As demais informações climáticas associadas ao local de coleta estão dispostas na Tabela 6.

Tabela 4. Dados de coleta do material vegetal de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

<i>Mês</i>	<i>Horário de Coleta</i>	<i>Coordenadas</i>
Janeiro	8:45	LAT 7° 9' 50,2" S LONG 35° 2' 5,22" W
Fevereiro	9:01	LAT 7° 9' 53,17" S LONG 35° 2' 5,10" W
Março	8:48	LAT 7° 9' 55,28" S LONG 35° 2' 5,04" W
Abril	8:54	LAT 7° 9' 41.2"S LONG 35° 2' 5.74"W
Maio	8:46	LAT 7° 9' 33.84 "S LONG 35° 1' 51.83 " W
Junho	8:58	LAT 7° 9' 32.008 "S LONG 35° 2' 14.392 "W
Julho	9:01	LAT 7° 9' 17.903"S LONG 35° 1' 59.869"W
Agosto	8:47	LAT 7° 9' 13.306"S LONG 35° 1' 31.904"W
Setembro	8:45	LAT 7° 9' 52.549"S LONG 35° 2' 4.042"W
Outubro	9:01	LAT 7° 9' 24.343"S LONG 35° 1' 46.121"W
Novembro	8:44	LAT 7° 9' 35.381"S LONG 35° 1' 57.86"W
Dezembro	9:02	LAT 7° 9' 20.664"S LONG 35° 1' 29.435"W

Fonte: ARAÚJO, 2021.

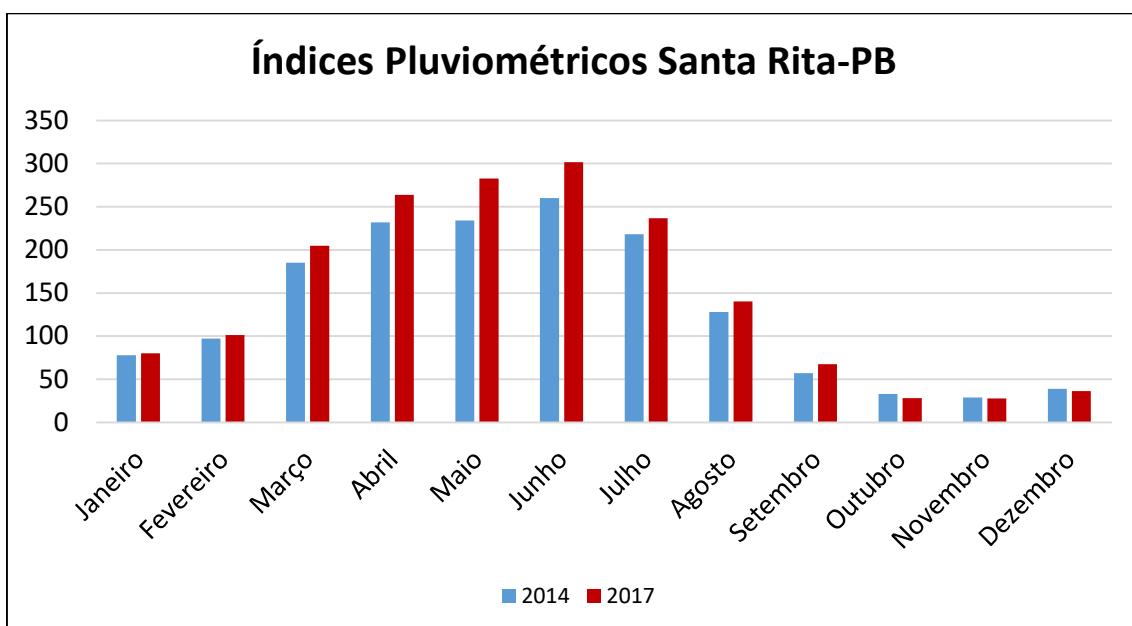
Tabela 5. Índices pluviométricos registrados em Santa Rita-PB nos anos de 2014 e 2017.

<i>Mês</i>	<i>2014^a (mm)</i>	<i>2017^b (mm)</i>
Janeiro	78	80,1
Fevereiro	97	101
Março	185	204,8
Abril	232	263,9
Maio	234	282,5
Junho	260	301,7
Julho	218	236,6
Agosto	128	140
Setembro	57	67,5
Outubro	33	28,1
Novembro	29	27,7
Dezembro	39	36,1
Média anual	1590 mm	1770 mm

Legenda: ^aAno correspondente à pluviometria média; ^bAno de coleta.

Fonte: CLIMATE-DATA, 2017; INMET, 2017.

Gráfico 1. Índices pluviométricos registrado no município de Santa Rita-PB nos anos de 2014 e 2017.

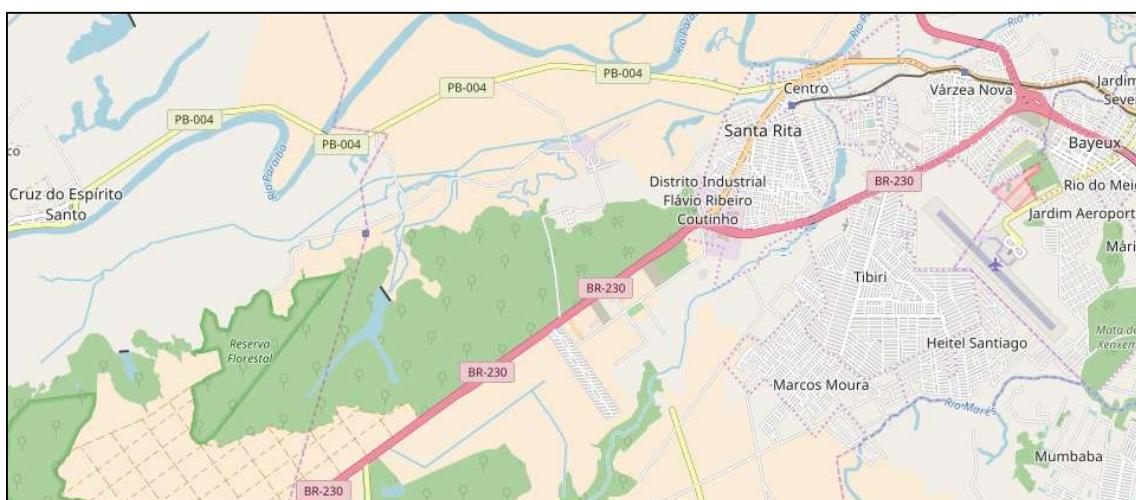


Fonte: CLIMATE-DATA, 2017; INMET, 2017.

Tabela 6. Dados climáticos do município de Santa Rita-PB.

Mês	Radiação (KJ/m ²)	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Pressão (hPa)	Ponto de orvalho (°C)
Janeiro	1759,49	27,61	69,68	1008,92	21,43
Fevereiro	1757,26	27,94	69,89	1008,38	21,79
Março	1576,81	27,69	75,05	1008,16	22,72
Abril	1486,06	27,28	77,34	1008,57	22,8
Maio	1304,41	26,17	81,83	1009,68	22,65
Junho	1217,06	25,45	82,68	1010,86	22,13
Julho	1069,24	23,94	84,54	1013,19	21,05
Agosto	1498,56	24,77	78,8	1012,28	20,68
Setembro	1637,1	25,31	74,36	1012,54	20,28
Outubro	1644,61	26,18	73,81	1010,45	21,02
Novembro	1838,6	27,08	69,27	1008,89	20,85
Dezembro	1767,3	28,28	67,65	1008,43	21,61
Média anual	1546,37	26,47	75,41	1010,03	21,58

Fonte: INMET, 2017.

Figura 14. Região de coleta da espécie *Monteverdia obtusifolia* Mart. no município de Santa Rita-PB.

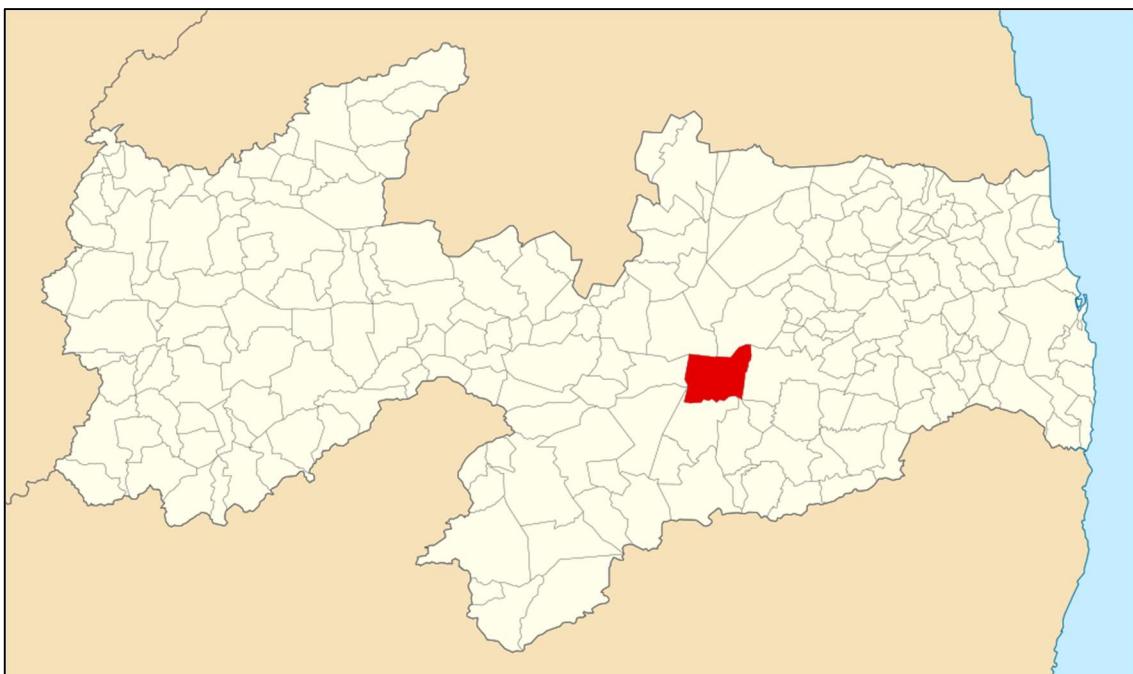
Fonte: Google Maps.

O material vegetal de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral foi coletado no município de Boa Vista (7°14'48,39" S, 36°16'8,12" W), situado na região do Cariri paraibano, no mês de junho de 2018. Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário JPB/UFPB (coleção de M. F. Agra *et al.*, 3316). O

presente estudo foi registrado junto ao SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob cadastro nº AF73B8C.

O município de Boa Vista-PB apresenta temperatura média anual de 23°C (19,2 – 29,8°C), índice pluviométrico de 418 mm e altitude média de 495 m acima do nível do mar (Figura 15) (AESÁ, 2018; CLIMATE-DATA, 2018).

Figura 15. Mapa do Estado da Paraíba com destaque para o município de Boa Vista-PB.



Fonte: Google Maps.

4.2 Processamento das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral

As folhas de *Monteverdia obtusifolia* Mart. (250 g) foram submetidas ao pré-tratamento com banho de nitrogênio líquido (*quenching*) imediatamente após a coleta. Recomenda-se congelar as folhas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta para promover a interrupção do metabolismo celular do organismo e assim, saber com precisão, posteriormente, como estava o metaboloma da planta naquele instante. Outra maneira de cessar as reações enzimáticas da planta, seria através da secagem, uma vez que elas ocorrem em meio aquoso (KIM; VERPOOTE, 2009; SCHIPSEMA, 2009).

As folhas frescas de *Monteverdia obtusifolia* Mart., não submetidas ao *quenching*, foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C

durante 72 horas. Em seguida, o material vegetal seco foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se o pó seco das folhas.

4.2.1 Obtenção do extrato etanólico bruto com *Quenching* (EEBq) das folhas

O material vegetal submetido ao banho de nitrogênio líquido (*quenching*) foi pesado (250 g), rasurado em diminutos pedaços e submetido à maceração com etanol a 96% em recipiente de aço inoxidável. Foram realizados três processos de extração contendo 2,5 litros de solvente (1:10) em cada repetição e intervalos de 72 horas entre eles, com objetivo de extrair a maior quantidade de constituintes químicos. As soluções extrativas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40°C.

4.2.2 Avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo do material vegetal de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral

Após processamento das folhas de *M. obtusifolia*, foram avaliados diferentes intervalos de tamanho de partícula, submetidos ou não à agitação, com o objetivo de verificar se havia influência deste parâmetro no rendimento dos teores de flavonoides totais, compostos fenólicos totais e dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina de acordo com as metodologias propostas no presente estudo.

Alíquotas de 50 g do pó das folhas de *M. obtusifolia* foram submetidos à separação por tamisação nos seguintes intervalos de tamanho de partícula: < 600 µm, > 600 µm e < 1200 µm e > 1200 µm. Em seguida, os pós segregados foram submetidos à extração utilizando 1,5 litros de etanol a 96% por 72 horas. Os processos extractivos foram diferenciados em dois grupos, com e sem agitação do recipiente.

Os recipientes foram agitados a cada 3 horas para aumentar o processo de interação droga vegetal x solvente e avaliar influência deste parâmetro na capacidade extractiva. As soluções extractivas obtidas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. Após a evaporação do solvente, foram obtidos 6 extratos etanólicos brutos,

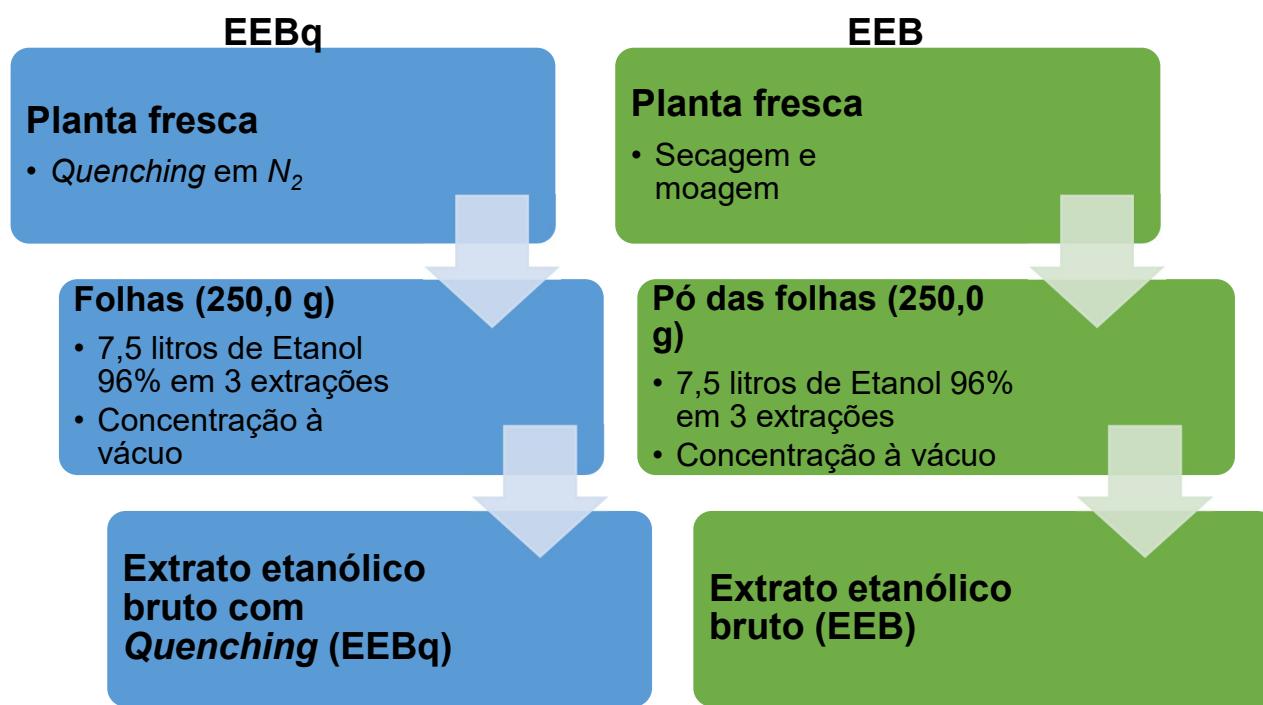
provenientes dos pós das folhas com diferentes tamanhos de partícula, sujeitos ou não à agitação.

4.2.3 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas secas em estufa

O material vegetal seco e pulverizado, com intervalo de tamanho de partícula $> 600 \mu\text{m}$ e $< 1200 \mu\text{m}$, foi pesado (250 g) e submetido à maceração com etanol a 96% em recipiente de aço inoxidável. Foram realizados três processos de extração contendo 2,5 litros de solvente em cada repetição e intervalos de 72 horas entre os mesmos, com objetivo de extrair a maior quantidade de constituintes químicos. As soluções extrativas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a temperatura de 40°C.

Após a evaporação do solvente, foram obtidos 12 extratos etanólicos brutos oriundos de material vegetal seco (EEB) e 12 extratos etanólicos brutos provenientes de folhas pré-tratadas com nitrogênio líquido (EEBq) de coloração verde escura. O Fluxograma 1 esquematiza o processo descrito anteriormente.

Fluxograma 1. Obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEB) e extratos submetidos ao quenching (EEBq) das folhas de *Monteverdia obtusifolia* Mart.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

4.3 Processamento do material vegetal de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral

As folhas, o caule, as cascas e o cerne das Raízes de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral, foram secos, separadamente, em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C por 72 horas. Em seguida, as alíquotas referentes às partes individuais do material vegetal foram submetidas à pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se o pó seco das folhas, do caule, das cascas da raiz e do cerne da raiz, respectivamente.

4.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral

O material vegetal seco e pulverizado (folhas, caule, cascas da raiz e cerne da raiz), com intervalo de tamanho de partícula > 600 µm e < 1200 µm, foram pesados (250 g) e submetidos à maceração com etanol a 96% em recipientes de aço inoxidável. Foram realizados três processos de extração contendo 2,5 litros de solvente em cada repetição e intervalos de 72 horas entre os mesmos. As soluções extractivas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. Após a evaporação do solvente, foram obtidos 4 extratos etanólicos brutos, respectivamente, provenientes dos materiais vegetais secos (EEB) da espécie.

4.4 Controle de qualidade do material vegetal

Os pós obtidos das folhas de *M. obtusifolia*, assim como, os pós das folhas, caule, cascas da raiz e cerne da raiz de *M. rigida* foram submetidos a testes de controle de qualidade para assegurar a qualidade dos materiais vegetais. Os ensaios foram conduzidos de acordo com os métodos gerais descritos no volume 1 da Farmacopeia Brasileira 6^a edição (BRASIL, 2019a), utilizando-se apenas os materiais vegetais secos, devido à perecibilidade do material submetido ao *quenching*, e estão disponíveis na Tabela 7.

Tabela 7. Ensaios de controle de qualidade dos materiais vegetais de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral e *Monteverdia rigida* (Mart) Biral.

Ensaio	Referência
Determinação de água em drogas vegetais	
Ensaio limite de metais pesados	
Determinação da densidade aparente de sólidos	
Determinação da granulometria dos pós	Farmacopeia Brasileira 6 ^a edição, vol. 1 (BRASIL, 2019a)
Determinação de cinzas totais	
Determinação de cinzas sulfatadas	
Determinação da contaminação microbiológica	
Flavonoides totais	SCHIMIDT; ORTEGA, 1983
Compostos fenólicos totais	SINGLETON <i>et al.</i> , 1999.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

4.4.1 Determinação de água em drogas vegetais

De acordo com o compêndio oficial (BRASIL, 2019a), são reconhecidos três métodos para a determinação de água em drogas vegetais: método volumétrico (Karl Fischer), método gravimétrico (dessecação) e método azeotrópico (destilação com tolueno). O método gravimétrico foi escolhido para

o ensaio de determinação de água em drogas vegetais. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.1.1 Método gravimétrico

Transferiu-se cerca de 2 g dos materiais vegetais secos, exatamente pesados, para um pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para as amostras, durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram dessecadas a 100-105 °C por 5 horas, até peso constante. O teor de água, em porcentagem, foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Água} = \frac{(Pa + Pf)_{\text{inicial}} - (Pa + Pf)_{\text{final}}}{Pa} \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pf – Peso do pesa-filtro (g)

4.4.2 Ensaio limite de metais pesados

O ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão em tubo de Nessler. O ensaio é semiquantitativo e possibilita inferir se a amostra passa ou não no teste, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra.

No preparo da *Solução estoque de nitrato de chumbo*, dissolveu-se exatamente 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 mL de água adicionada de 1 mL de ácido nítrico. Em seguida diluiu-se com água para 1000 mL e homogeneizou-se. A solução foi preparada e armazenada em recipientes de vidro isentos de sais solúveis de chumbo.

A *Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* foi preparada no dia do uso. Foram diluídos 10 mL da solução estoque de nitrato de chumbo para 100 mL com água. Cada mililitro dessa solução contém o equivalente a 10 µg de chumbo/mL (10 ppm Pb).

Para o preparo do *Tampão acetato pH 3,5*, foram dissolvidos 25,0 g de acetato de amônio em 25 mL de água e adicionou-se 38 mL de ácido clorídrico 6 M. O pH foi ajustado em 3,5 com hidróxido de amônio 6 M e ácido clorídrico 6 M. Em seguida, foi diluído para 100 mL com água e posteriormente homogeneizado.

O reagente de tioacetamida foi preparado pela dissolução de 4 g de tioacetamida em água, em seguida o volume foi completado para 100 mL com água. Foram transferidos 0,2 mL da solução reagente à 1 mL da mistura de hidróxido de sódio 1 M, 5 mL de água e 20 mL de glicerina. O material foi aquecido em banho-maria por 20 s, resfriado e utilizado imediatamente.

No preparo da amostra, foram transferidos 2 g dos pós dos materiais vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* para tubo adequado e diluiu-se com água para 25 mL. O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. Em seguida, a amostra foi diluída com água para aproximadamente 40 mL e foi, posteriormente, homogeneizada.

No preparo do padrão, foram transferidos 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) para o tubo, em seguida foi diluído para 25 mL com água. O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. O padrão foi diluído novamente com água para aproximadamente 40 mL e, posteriormente, homogeneizado.

Para o preparo do controle transferiu-se, para um terceiro tubo, 2 g da amostra e adicionou-se 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb). O pH foi ajustado para a faixa de 3,0 – 4,0 com ácido acético 1 M. Em seguida, o controle foi diluído com água para aproximadamente 40 mL e homogeneizado.

A cada uma das preparações, foram adicionados 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida. Em seguida, foram realizadas novas diluições com água para 50 mL, homogeneizou-se e ficaram em repouso por 2 minutos. Após 2 minutos, uma coloração que varia do amarelo ao preto foi desenvolvida. Os tubos foram observados de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco (BRASIL, 2019a).

4.4.3 Densidade aparente de sólidos

Para avaliação da densidade aparente de sólidos sem compactação, adicionaram-se, cuidadosamente, quantidades dos pós dos materiais vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* equivalentes a 50 mL de uma proveta vazia previamente tarada na balança (BRASIL, 2019a). Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores das densidades foram calculados segundo a equação:

$$\text{Densidade aparente (g/mL)} = \frac{m}{v}$$

Onde: m – massa da amostra (g)

v – volume ocupado pela amostra (mL)

4.4.4 Determinação da granulometria de pós

A granulometria é determinada com o auxílio de tamises operados por dispositivo mecânico. Este tipo de dispositivo reproduz os movimentos horizontais e verticais da operação manual, através da ação mecânica uniforme. Para a determinação da granulometria, foram utilizados tamises com abertura de malha de 250, 425, 500, 1000, 1180 µm e 1,70 mm, em um tamisador Produtest®. Foram pesados 25,0 g das drogas vegetais, e as amostras foram transferidas para o tamis superior, distribuindo uniformemente o pó. O conjunto foi tampado, e o aparelho foi acionado por 15 minutos. Após o término da análise, a amostra retida na superfície superior de cada malha foi pesada, incluindo o material do coletor (BRASIL, 2019a). As análises foram realizadas em triplicata. O percentual retido em cada tamis foi obtido, utilizando o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Retida no tamis} = \frac{p1}{p2} \times 100$$

Onde: p1 - Peso da amostra retida em cada tamis (g)

p2 - Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g)

100 - Fator de porcentagem.

4.4.5 Determinação de cinzas

4.4.5.1 Determinação de cinzas totais

De acordo com o compêndio oficial, para proceder com a realização do ensaio de cinzas totais, pesou-se, exatamente, 3,0000 g das amostras secas pulverizadas e transferiu-se para o cadiño de platina previamente calcinado, resfriado e tarado. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadiño e foram incineradas aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo, $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$, até que todo o carvão fosse eliminado (BRASIL, 2019a).

Após resfriamento em dessecador, os materiais foram pesados. A porcentagem de cinzas foi calculada pela equação:

$$\% \text{ Cinzas totais} = 1 - \left[\frac{(Pa + Pc)\text{ inicial} - (Pa + Pc)\text{ final}}{Pa} \right] \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pc – Peso do cadiño (g)

4.4.5.2 Determinação de cinzas sulfatadas

Em cadiños previamente calcinados, resfriados e tarados, pesou-se, exatamente, 1,0000 g das drogas vegetais secas e pulverizadas. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadiño, ao qual foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, as amostras foram carbonizadas em bico de Bunsen até que não se observasse o desprendimento de fumaça branca. Após a carbonização, o cadiño foi incinerado na mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente até a temperatura de 800°C , até que não fosse detectada a presença de partículas negras. Após a primeira incineração, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado ao resíduo. Os resíduos foram secos até peso constante (BRASIL, 2019a).

Após resfriamento em dessecador, os materiais foram pesados. A porcentagem de cinzas sulfatadas foi calculada pela equação:

$$\% \text{ Cinzas sulfatadas} = 1 - \left[\frac{(Pa + Pc)\text{ inicial} - (Pa + Pc)\text{ final}}{Pa} \right] \times 100$$

Onde: Pa – Peso da amostra (g)

Pc – Peso do cadiño (g)

4.4.6 Doseamento de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método espectrofotométrico proposto por Schmidt e Ortega (1983), com adaptações, utilizando a técnica de complexação com cloreto de alumínio ($AlCl_3$). Visando padronizar metodologias e determinar especificações, a presente metodologia foi submetida à validação analítica atendendo à resolução RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017). Os dados detalhados foram apresentados no Apêndice A.

Para a realização do teste, 100 μL da solução metanólica dos extratos de *Monteverdia obtusifolia* e *Monteverdia rigida* (1mg/mL) foram tratados com 100 μL da solução de cloreto de alumínio (2,5%). As amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek, USA) a 425 nm (MARQUES et. al, 2012).

Os resultados do teor de flavonoides totais foram expressos como equivalentes de queracetina (μg EQ/mg de extrato) (Sigma-Aldrich, USA), calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variaram de 10 a 250 $\mu g/mL$.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos devem estar contemplados pelo intervalo de concentração utilizado para a obtenção da curva de calibração.

4.4.7 Doseamento de compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos nos extratos etanólicos de *Monteverdia obtusifolia* e *Monteverdia rigida* foram determinadas através do método espectrofotométrico desenvolvido por Singleton e colaboradores (1999). Visando padronizar metodologias e determinar especificações, a presente metodologia foi submetida à validação analítica atendendo à resolução RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017). Os dados detalhados foram apresentados no Apêndice B.

Brevemente, 120 µL da solução metanólica dos extratos de *M. obtusifolia* e *M. rigida* (1 mg/mL) foram misturados à 500 µL do reagente Folin-Ciocalteau (diluído 1:10) e 400 µL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek, USA) a 765 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (µg EAG/mg de extrato) (Sigma-Aldrich, USA), calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variaram de 7,5 a 500 µg/mL.

4.4.8 Determinação da contaminação microbiológica

4.4.8.1 Determinação do número total de microrganismos mesofílicos

A metodologia foi realizada de acordo com as instruções descritas na Farmacopeia Brasileira 6^a edição, volume 1 (BRASIL, 2019a).

Foi preparada uma suspensão de 10,0 g da mistura de amostra em solução tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0. Em seguida, adicionou-se em placas de Petri, separadamente, 15 - 20 mL de ágar caseína soja e ágar Sabouraud-dextrose e aguardou a solidificação. Adicionou-se à superfície de cada meio de cultura 0,1 mL da amostra preparada.

As placas contendo ágar caseína-soja foram incubadas a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3-5 dias e as placas contendo ágar Sabouraud-dextrose a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5 - 7 dias para determinação do número de micro-organismos aeróbicos totais e bolores e leveduras, respectivamente.

4.4.8.2 Pesquisa de patógenos

4.4.8.2.1 Bactérias gram-negativas bile tolerantes

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser testado, com caldo caseína-soja (Diluição A) como diluente. A diluição A foi homogeneizada e 1 mL do produto foi transferido para o Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias segundo Mossel. A amostra foi incubada a

32,5 °C ± 2,5 °C por 24 a 48 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.8.2.2 *Escherichia coli*

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja). Foi homogeneizada e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas.

Para seleção e subcultura, transferiu-se 1 mL da amostra enriquecida para 100 mL de Caldo MacConkey. Incubou-se a 43 °C ± 1 °C durante 24 – 48 horas. A subcultura foi realizada em placa de Agar MacConkey e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 72 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.8.2.3 *Salmonella*

A amostra foi preparada usando a diluição 1:10 de não menos que 10 g, do produto a ser examinado. Homogeneizou-se e incubou-se a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas. Para seleção e subcultura, transferiu-se 0,1 mL do conteúdo para 10 mL de Caldo Enriquecimento *Salmonella* Rappaport Vassiliadis. Incubou-se a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas. A subcultura foi realizada em placa contendo Agar Xilose Lisina Desoxicolato e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 48 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.8.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja). Foi homogeneizada e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas.

Para seleção e subcultura, homogeneizar e transferir uma alça para placa contendo Ágar cetrímidia. Incubou-se a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 – 72 horas. O crescimento de colônias indica presença provável de *Pseudomonas*

aeruginosa que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.8.2.5 *Staphylococcus aureus*

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja). Foi homogeneizada e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas.

Para seleção e subcultura, após o período de incubação, foi semeado 0,1 mL da amostra enriquecida no Ágar sal de manitol pela técnica de espalhamento. Incubou-se a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 – 72 horas. O crescimento de colônias amarelas ou brancas rodeada por uma zona amarela indica presença provável de *S. aureus* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

4.4.8.2.6 *Candida albicans*

A amostra foi preparada utilizando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado. Utilizou-se 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo Sabouraud-dextrose. Foi homogeneizada e incubada a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 a 5 dias.

Para seleção e subcultura, após o período de incubação, foi semeado 0,1 mL da amostra enriquecida no Ágar Sabouraud-dextrose pela técnica de espalhamento. Incubou-se a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 24 – 48 horas. O crescimento de colônias brancas em Ágar Sabouraud-dextrose indica presença provável de *C. albicans* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

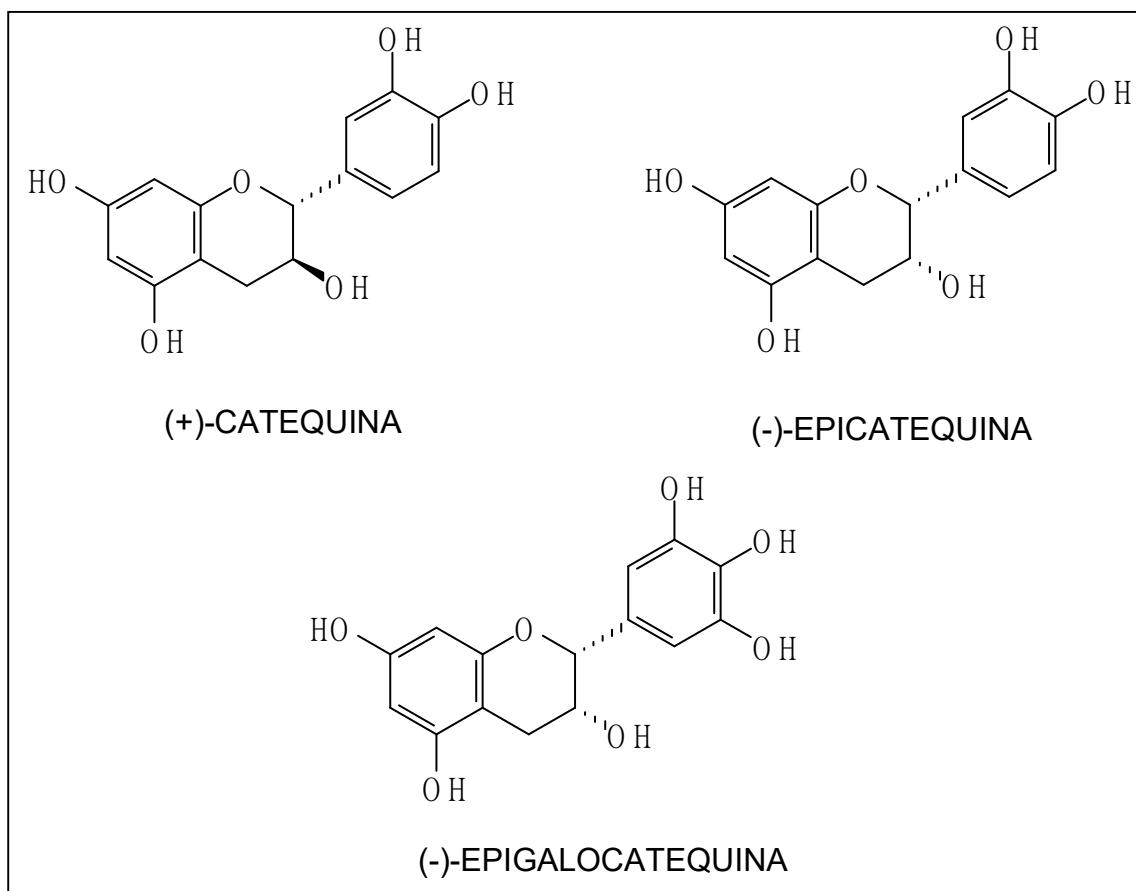
4.5 Padronização química

4.5.1 Substâncias químicas de referência

As substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas como marcadores nas análises por CLAE, foram adquiridas à Sigma-Aldrich, USA. No Quadro 5

são apresentados os marcadores utilizados na validação e suas respectivas estruturas.

Quadro 5. Marcadores utilizados na validação dos extratos do gênero *Monteverdia* e suas respectivas estruturas.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

As três SQR são flavonoides da classe dos flavanóis. O composto (-)-Epicatequina corresponde ao (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol e seu isômero (+)-Catequina ao (2R,3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol. O composto (-)-Epigalocatequina corresponde ao (2R,3R)-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopirano-3,5,7-triol.

4.5.2 Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para as análises foram grau CLAE (Merck, Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através do equipamento Milli-Q Gradient® (Millipore, Bedford, MA, EUA), utilizando-se água com condutividade menor que 0,50 μ S/cm em todas as análises.

4.6 Validação de metodologia analítica

A metodologia utilizada para as análises, por cromatografia líquida de alta eficiência, foi desenvolvida e validada no laboratório de Controle de Qualidade da HEBRON – Indústria Química Farmacêutica Nacional, utilizando um cromatógrafo líquido (Young Lin, Coreia do Sul) (Figura 16) série YL9100, constituído de bomba quaternária YL9110, detector de arranjo de diodos (DAD) YL9160, degasificador a vácuo YL9101, compartimento de coluna YL9131 e injetor automático YL9150. A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software YL-Clarity.

A fase móvel A consistiu em solução de ácido fosfórico 14 mM e a fase móvel B de acetonitrila pura. Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,45 μ m (Millipore, Bedford, EUA).

As separações foram realizadas através de um gradiente de eluição: de 0 a 38 min, a solução B seguindo uma mudança linear de 5% a 25%, a partir de 38 a 43 min, isocrática com 25% de B, de 43-48 min, com a solução B alterando linearmente de 25% a 100%. Entre 48-55 minutos o método foi mantido no modo isocrático (100% B), retornando linearmente para 5% da solução B no período de 55-60 min. Utilizou-se fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, temperatura de forno 40°C e volume de injeção de 10 μ L. A detecção foi realizada por UV no comprimento de onda em 280 nm e empregou-se coluna analítica C18 LiChrocart Purospher Star 150mm x 4,6mm x 5 μ m (Merck, Alemanha), com pré-coluna (Merck, Alemanha) 4x4 mm de mesma composição (ARAÚJO, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2020).

De acordo com a classificação para testes analíticos, descrita na RE nº 899, de maio de 2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos) da ANVISA, o método proposto enquadra-se na Categoria I, cujos ensaios necessários são especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

O método desenvolvido previamente foi específico, linear, preciso, exato e robusto para os marcadores analisados. Entretanto, foi necessário realizar um processo de validação parcial para atender às exigências da RE 899 de 2003 (item 2.6, subitem 2.6.1) e RDC 166 de 2017 (Art 9º, Art 8º), em casos de

transferência de metodologia entre laboratórios. Para validação parcial de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência foram necessários reavaliar os parâmetros linearidade, precisão, especificidade e exatidão (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

As análises cromatográficas da validação parcial foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu® (Prominence) (Figura 17) equipado com módulo de bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, auto injetor SIL-20A HT, um sistema de degaseificação DGU-20A5R, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A diode array e controlador CBM-20A. A coluna utilizada foi Shim-pack® C18 (150 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna Shim-pack G® ODS (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

As SQR e o extrato etanólico seco (EEB) de *M. obtusifolia* referente ao mês de janeiro/2017 foram utilizados no processo de validação parcial, possibilitando as análises das demais amostras produzidas.

Figura 16. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Young Lin®.



Fonte: ARAÚJO, 2016.

Figura 17. Cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD Shimadzu®.



Fonte: ARAÚJO, 2018.

4.6.1 Seletividade

Este parâmetro foi avaliado por meio da comparação dos tempos de retenção e perfis de pureza dos três marcadores. As substâncias de referência foram analisadas nas seguintes concentrações: (-)-Epigalocatequina 30 µg/mL, (+)-Catequina 13,5 µg/mL e (-)-Epicatequina 6,60 µg/mL.

O EEB de *M. obtusifolia* (Janeiro/2017) foi analisado na concentração de 1 mg/mL. A fase móvel, solução diluente e o etanol 96% utilizados na preparação do extrato, foram avaliados, com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD), em análise de 190 a 800 nm, com intuito de verificar a existência de algum pico coeluindo nos tempos de retenção dos marcadores.

4.6.2 Linearidade

O parâmetro foi avaliado por meio da análise de preparações dos marcadores nas seguintes concentrações: (-)-Epigalocatequina (9 – 90 µg/mL);

(+)-Catequina (4,05 – 40,5 µg/mL); (-)-Epicatequina (3,3 – 13,2 µg/mL). Estas foram obtidas, por meio de diluições utilizando padrão externo, em triplicata, resultando em 27, 27 e 21 soluções padrões para análise, respectivamente.

4.6.2.1 Solução estoque de (-)-Epigalocatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 3,00 mg da substância química de referência (-)-Epigalocatequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 150 µg de (-)-Epigalocatequina/mL

a) 9 µg/mL: pipetou-se 0,3 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 9 µg/mL

b) 15 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 15 µg/mL

c) 24 µg/mL: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 24 µg/mL;

d) 27 µg/mL: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 27 µg/mL;

e) 30 µg/mL: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 30 µg/mL;

- f) 33 µg/mL: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 33 µg/mL;

- g) 36 µg/mL: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 36 µg/mL;

- h) 60 µg/mL: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 60 µg/mL;

- i) 90 µg/mL: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 90 µg/mL

4.6.2.2 Solução estoque de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,35 mg da substância química de referência (+)-Catequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 67,5 µg de (+)-Catequina/mL

- j) 4,05 µg/mL: pipetou-se 0,3 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 4,05 µg/mL

- k) 6,75 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 6,75 µg/mL

- l) 10,8 µg/mL: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 10,8 µg/mL;

- m) 12,15 µg/mL: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 12,15 µg/mL;

- n) 13,5 µg/mL: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 13,5 µg/mL;

- o) 14,85 µg/mL: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 14,85 µg/mL;

- p) 16,2 µg/mL: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 16,2 µg/mL;

- q) 27 µg/mL: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 27 µg/mL;

- r) 40,5 µg/mL: pipetou-se 3,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 40,5 µg/mL

4.6.2.3 Solução estoque de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,65 mg da substância química de referência (-)-Epicatequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 33 µg de (-)-Epicatequina/mL

- s) 3,3 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 3,3 µg/mL;

- t) 5,28 µg/mL: pipetou-se 0,8 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 5,28 µg/mL;

- u) 5,94 µg/mL: pipetou-se 0,9 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 5,94 µg/mL;

- v) 6,6 µg/mL: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 6,6 µg/mL;

- w) 7,26 µg/mL: pipetou-se 1,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 7,26 µg/mL;

- x) 7,92 µg/mL: pipetou-se 1,2 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 7,92 µg/mL;

- y) 13,2 µg/mL: pipetou-se 2,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 13,2 µg/mL;

Após o preparo, todas as soluções obtidas na linearidade foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13 mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

4.6.3 Efeito matriz

Para a avaliação do parâmetro de efeito de matriz, foi utilizada a técnica de adição de padrão externo. Foram preparadas soluções estoque dos respectivos marcadores químicos (-)-Epigalocatequina (conforme item 3.6.2.1), (+)-Catequina (conforme item 3.6.2.2) e (-)-Epicatequina (conforme item 3.6.2.3) e em seguida, as concentrações do intervalo de trabalho de cada marcador foram obtidas pela adição à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (volume fixo de 1000 µL). O volume final foi completado com metanol. De modo que as concentrações finais de análise corresponderam às utilizadas na avaliação da linearidade.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 4.6.

O efeito matriz pode ser mensurado por meio da Equação:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left[\frac{\text{Coeficiente angular curva matriz}}{\text{Coeficiente angular curva solvente}} - 1 \right] \times 100$$

O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (BRASIL, 2017). Foram avaliados o percentual de efeito matriz de cada marcador de acordo com a equação acima, bem como foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para

verificar se as variâncias das amostras não-matrizadas e matrizadas podem ser consideradas estatisticamente iguais, seguido de t de Student: comparação das médias.

4.6.3.1 Efeito matriz para (-)-Epigallocatequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epigallocatequina (150 µg/mL) à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral (1 mg/mL) (Tabela 8).

Tabela 8. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epigallocatequina.

Concentração (µg/mL)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (µL)	Solução Amostra (µL)	Volume final (µL)
9	150 µg/mL	100	1000	5000
15	150 µg/mL	300	1000	5000
24	150 µg/mL	600	1000	5000
27	150 µg/mL	700	1000	5000
30	150 µg/mL	800	1000	5000
33	150 µg/mL	900	1000	5000
36	150 µg/mL	1000	1000	5000
60	150 µg/mL	1800	1000	5000
90	150 µg/mL	2800	1000	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

4.6.3.2 Efeito matriz para (+)-Catequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (+)-Catequina (67,5 µg/mL) à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral (1 mg/mL) (Tabela 9).

Tabela 9. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (+)-Catequina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (μL)	Solução Amostra (μL)	Volume final (μL)
4,05	67,5 $\mu\text{g/mL}$	100	1000	5000
6,75	67,5 $\mu\text{g/mL}$	300	1000	5000
10,8	67,5 $\mu\text{g/mL}$	600	1000	5000
12,15	67,5 $\mu\text{g/mL}$	700	1000	5000
13,5	67,5 $\mu\text{g/mL}$	800	1000	5000
14,85	67,5 $\mu\text{g/mL}$	900	1000	5000
16,2	67,5 $\mu\text{g/mL}$	1000	1000	5000
27	67,5 $\mu\text{g/mL}$	1800	1000	5000
40,5	67,5 $\mu\text{g/mL}$	2800	1000	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

4.6.3.3 Efeito matriz para (-)-Epicatequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epicatequina (33 $\mu\text{g/mL}$) à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral (1 mg/mL) (Tabela 10).

Tabela 10. Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epicatequina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (μL)	Solução Amostra (μL)	Volume final (μL)
3,3	33 $\mu\text{g/mL}$	300	1000	5000
5,28	33 $\mu\text{g/mL}$	600	1000	5000
5,94	33 $\mu\text{g/mL}$	700	1000	5000
6,6	33 $\mu\text{g/mL}$	800	1000	5000
7,26	33 $\mu\text{g/mL}$	900	1000	5000
7,92	33 $\mu\text{g/mL}$	1000	1000	5000
13,2	33 $\mu\text{g/mL}$	1800	1000	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

4.6.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

De acordo com os guias para validação de metodologias analíticas disponíveis na literatura, é possível realizar a determinação dos valores de LD e LQ por extração matemática da curva de calibração ao analisar os padrões dos marcadores em concentrações decrescentes (FDA, 2015; EMA, 2016; BRASIL, 2017; MARSON *et al.*, 2020) Os valores podem ser obtidos de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Limite de detecção: } \frac{3 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

Para o cálculo do limite de quantificação foi utilizada a equação:

$$\text{Limite de quantificação: } \frac{10 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

Foram quantificados os limites de detecção e quantificação para os marcadores (-)-epigalocatequina, (+)-catequina e (-)-epicatequina utilizando os dados obtidos na linearidade com solvente e na linearidade para verificação do efeito matriz.

4.6.5 Precisão

4.6.5.1 Preparo das amostras

a) Preparo da solução padrão de (-)-Epigalocatequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 3,00 mg da substância química de referência (-)-Epigalocatequina e transferiu-se para um balão

volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol. Foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de metanol. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 µm x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 30 µg de (-)-Epigallocatequina/mL

b) Preparo da solução padrão de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 1,35 mg da substância química de referência (+)-Catequina e transferiu-se para um balão volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol. Foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de metanol. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 µm x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 13,5 µg de (+)-Catequina/mL

c) Preparo da solução padrão de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica exatamente de 1,65 mg da substância química de referência (-)-Epicatequina e transferiu-se para um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol. Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de metanol. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 µm x 13 mm diâmetro.

Concentração final da solução padrão = 6,6 µg de (-)-Epicatequina/mL

d) Preparo da solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 50 mg do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (EEB) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL adicionando 5,0 mL de solução diluente (água:metanol – 85:15). Em

seguida o material foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos e após retorno à temperatura ambiente, completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente (água:metanol – 85:15). Foi retirada uma alíquota de 1,0mL e diluída para balão volumétrico de 5,0 mL, completando o volume com q.s.p. de solução diluente (água:metanol – 85:15). Concentração final da solução amostra = 1 mg/mL de extrato etanólico. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (Merck, Alemanha) de 0,45 µm x 13 mm diâmetro.

4.6.6 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de 6 determinações a 100% da concentração do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (1 mg/mL de extrato) conforme Art. 38, item II da RDC Nº 166/2017 (BRASIL, 2017), com o mesmo analista e mesma instrumentação. Para avaliação da precisão foram preparadas 3 soluções-mãe conforme item 4.6.5.1.d, e a leitura foi realizada em triplicata. Os resultados foram avaliados considerando a área do pico referente aos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina e o coeficiente de variação percentual, relativo a seis repetições, tendo como critério de aceitação coeficiente de variação menor que 5 % (BRASIL, 2003).

4.6.7 Precisão Intermediária

A determinação da precisão intermediária foi realizada por um segundo analista, nos dois dias seguintes da repetibilidade, avaliando seis determinações a 100% da concentração do extrato etanólico de *M. obtusifolia*, utilizando a mesma instrumentação e método analítico da repetibilidade.

4.6.8 Exatidão

Para avaliar esse parâmetro foram preparadas 3 amostras, em triplicata, nas concentrações 80%, 100% e 120% da concentração teórica do teste (total de 9 amostras). Para análise deste parâmetro, utilizou-se método por adição de padrão externo, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de analito (marcador) à solução da amostra de extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia*.

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação das soluções de marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina

adicionadas às amostras de solução do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia*. O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epigalocatequina 150 µg/mL, (+)-Catequina 67,5 µg/mL e (-)-Epicatequina 33 µg/mL à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. contendo concentração teórica dos analitos semelhantes aos marcadores, conforme abaixo:

4.6.8.1 Solução estoque de (-)-Epigalocatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 3,0000 mg da substância química de referência (-)-Epigalocatequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 150 µg de (-)-Epigalocatequina/mL

4.6.8.2 Solução estoque de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,35 mg da substância química de referência do marcador (+)-Catequina e, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 20,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 67,5 µg de (+)-Catequina/mL

4.6.8.3 Solução estoque de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,65 mg da substância química de referência do marcador (-)-Epicatequina e, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 33 µg de (-)-Epicatequina/mL

4.6.8.4 Solução estoque do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 50 mg do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL adicionando 5,0 mL de solução diluente. Em seguida o material foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos e após retorno à temperatura ambiente, completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente.

a) Exatidão 80%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (amostra-50%), e 0,3 mL das soluções estoque de (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina (padrão-30%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13 mm diâmetro, ou equivalente.

b) Exatidão 100%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. (amostra-50%), e 0,5 mL das soluções estoque de (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina (padrão-50%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13 mm diâmetro, ou equivalente.

c) Exatidão 120%

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. (amostra-50%), e 0,7 mL das soluções estoque de (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina (padrão-70%). Transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com q.s.p. de solução diluente. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13 mm diâmetro, ou equivalente.

O critério de conformidade foi de 90 a 110 % de recuperação (BRASIL, 2003; 2017).

4.6.9 System suitability

O teste de adequação do sistema é parte integrante de muitos procedimentos analíticos. Os testes baseiam-se no conceito de que o equipamento, a eletrônica, as operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal. Os parâmetros de teste de adequação do sistema a serem estabelecidos para um determinado procedimento dependem do tipo de procedimento que está sendo validado (ICH, 2005). Para avaliação da adequabilidade de sistemas de cromatografia líquida foram avaliados o fator de capacidade (k'), resolução (Rs), fator de cauda/assimetria de pico (tailing factor) e número de pratos teóricos (N) de amostras contendo o extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia* na concentração de 1mg/mL (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

4.7 Estudo de sazonalidade de *Monteverdia obtusifolia* Mart

O estudo sazonal tem como objetivo avaliar as variações químicas na composição das folhas da espécie em estudo. Foram preparados extratos etanólicos brutos mensais das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral, de modo que os teores de metabólitos secundários foram avaliados ao longo dos 12 meses do ano (janeiro 2017 a dezembro 2017).

Para a avaliação dos compostos fenólicos foram verificadas as oscilações de teor dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina nos extratos etanólicos secos (EEB) e extratos etanólicos submetidos ao *quenching* (EEBq) da espécie em estudo. A metodologia analítica utilizada está descrita no item 3.6 do presente estudo e foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, modelo Prominence UFC, Shimadzu[®], Japão) para a quantificação dos marcadores. As amostras foram analisadas em triplicata na concentração de 1 mg/mL dos extratos etanólicos de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral.

4.8 Análise de componentes principais (Principal Component Analysis - PCA)

Os cromatogramas obtidos a partir da análise dos extratos etanólicos brutos obtidos das folhas de *M. obtusifolia* em diferentes meses (Janeiro – Dezembro/2017), foram submetidos a análise dos componentes principais. Os arquivos dos espectros CL-EM no formato mzXML foram utilizados como dados de entrada na plataforma XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu>) para realizar o alinhamento dos espectros e converter as variáveis *m/z* e *tempo* em uma única variável. Os dados dos espectros de massas, mais precisamente, os valores de integrais das áreas dos diferentes fragmentos (*m/z*) em função do tempo de retenção das extrações feitas a partir das folhas foram utilizados e exportados em arquivo texto no formato csv. Estes dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) com o software Unscrambler® versão 9.7 (CAMO Process AS, Noruega), sendo previamente utilizado a normalização de área para cada amostra. Esta transformação normaliza o espectro X_i , calculando a área sob a curva $\sum x_{ij}$. Após a normalização, a área sobre a curva é a mesma para todos os espectros (SMITH *et al.*, 2006; GOWDA *et al.*, 2014; PIASECKA; KACHLICKI; STOBIECKI, 2019).

4.9 Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)

A HCA (do inglês, “*hierarchical clustering analysis*”) é um método de aprendizado não supervisionado. Nesse estudo empregou-se o método Sequential Agglomerative Hierarchical Non-overlapping implementado no software KNIME v. 4.4. Nesse método, cada composto representa um grupo (do inglês, *cluster*) no início. Então, os “*n*” compostos são agrupados interativamente em grupos usando suas distâncias euclidianas armazenadas em uma matriz quadrada de distâncias simétricas (*n* * *n*). Os dois objetos mais próximos (compostos ou grupos) são interativamente identificados e agrupados para formar um novo grupo. A matriz de distâncias é atualizada com as novas distâncias separando o novo grupo dos demais, de acordo com o tipo de acoplamento selecionado pelo usuário (nesse estudo foi usado o acoplamento completo). O processo se repete até que reste apenas um grupo. A relação sequencial de formação dos grupos resulta em um gráfico hierárquico chamado

de dendograma. Esse software gera um dendograma e um mapa de calor (*heatmap*) da matriz de distância colorida de acordo com a similaridade/dissimilaridade entre os compostos (DE SOUZA *et al.*, 2017; ASH *et al.*, 2019).

4.10 Doseamento de flavan-3-óis nos extratos de *Monteverdia rigida*

Os extratos etanólicos brutos obtidos a partir das diferentes partes (folhas, caule, cascas da raiz e cerne da raiz) de *M. rigida* foram submetidos à análise por CLAE-DAD, utilizando os parâmetros descritos no item 3.6, com objetivo de quantificar os marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina. As amostras foram analisadas em triplicata na concentração de 1 mg extrato/mL.

4.11 Análise do perfil químico por CLAE-IES-EMⁿ

Os extratos etanólicos obtidos das folhas de *M. obtusifolia* e das diferentes partes de *M. rigida* (folhas, caule, cascas da raiz e raízes) foram analisados por CLAE Prominence UFC, Shimadzu[®], utilizando coluna cromatográfica analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 µm), acoplado a espectrômetro de massas (Ion-Trap AmazonX, Bruker[®]), com ionização por Eletrospray (IES).

Para realização das análises, as amostras foram solubilizadas em metanol (1 mg/mL), com posterior filtração em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), com malha de 0,45 µm. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (Mili-Q), acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 minutos). O volume de injeção foi de 10 µL e a taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto. No espectrômetro de massas, as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM³. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8 mL/minuto e temperatura de 300 °C. As amostras foram analisadas no modo de ionização negativo e a identificação dos compostos foram baseadas nos dados (EMⁿ) reportados pela literatura.

4.12 Rede Molecular

Os dados obtidos dos extratos etanólicos das folhas, caule, cascas da raiz e raízes de *M. rigida* obtidos por CLAE- EM² no modo negativo, foram convertidos para o formato mzXML através do programa Bruker DataAnalysis® versão 4.2. A rede molecular foi gerada utilizando a plataforma online *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>), seguindo os parâmetros de tolerância de massa do íon precursor de 2,0 Da, e de 0,5 Da para o íon fragmento, com mínimos de pares de cosseno de 0,7. A rede molecular obtida foi posteriormente visualizada através do software Cytoscape® versão 3.8.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo do material vegetal de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral

Os resultados obtidos na avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo estão apresentados na Tabela 11. Os dados foram compilados e representados nos gráficos reunidos na Figura 18.

A definição adequada do tamanho de partícula é muito importante para o processo de extração. A escolha do método de moagem e do material a ser moído são parâmetros que devem ser considerados para maximizar a eficiência do processo. Pós muito finos podem atrapalhar processos extractivos como percolação e maceração, resultando no aumento do tamanho das partículas e na formação de canais preferenciais, o que requer filtração adicional sob pressão, além disso, muitas partículas são separadas apenas por decantação (SHARAPIN, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Fragmentos maiores, entretanto, podem dificultar a penetração do solvente, retardando o processo de extração. O aspecto mais importante é a uniformidade do tamanho das partículas, que é obtida pelo processo de tamisação (MARQUES; VIGO, 2009).

Tabela 11. Resultados da avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.

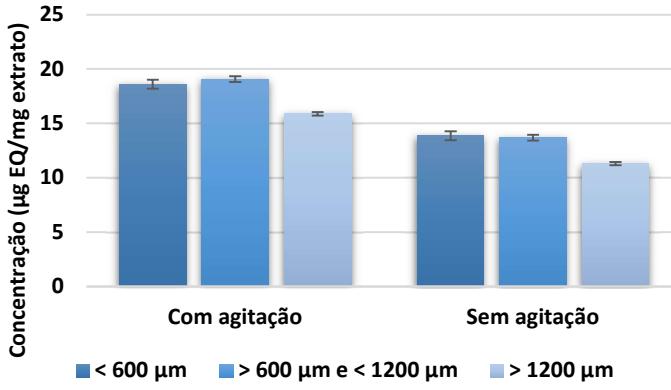
	Com agitação			Sem agitação		
	< 600 µm	> 600 µm e < 1200 µm	> 1200 µm	< 600 µm	> 600 µm e < 1200 µm	> 1200 µm
Flavonoides totais (µg EQ/mg de extrato)	18,60 ± 0,41	19,09 ± 0,27	15,89 ^a ± 0,16	13,86 ± 0,39	13,68 ± 0,37	11,32 ^f ± 0,30
Fenólicos totais (µg EAG/mg de extrato)	75,08 ± 0,73	76,12 ± 0,44	62,84 ^b ± 0,87	60,86 ± 0,53	60,61 ± 0,47	48,63 ^g ± 0,35
Epigallocatequina (µg/mg de extrato)	5,21 ± 0,12	5,26 ± 0,08	4,24 ^c ± 0,09	3,94 ± 0,09	4,06 ± 0,07	3,14 ^h ± 0,07
Catequina (µg/mg de extrato)	2,69 ± 0,03	2,73 ± 0,04	2,18 ^d ± 0,03	1,96 ± 0,05	1,92 ± 0,04	1,60 ⁱ ± 0,02
Epicatequina (µg/mg de extrato)	1,36 ± 0,03	1,39 ± 0,02	1,02 ^e ± 0,03	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,81 ^j ± 0,01

*Dados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes em $p < 0,05$. ^aFcalc (100,94) > Ftab (5,14); valor-P $2,4 \times 10^{-5} < 0,05$. ^bFcalc (48,15) > Ftab (5,14); valor-P 0,0002 < 0,05. ^cFcalc (101,30) > Ftab (5,14); valor-P $2,38 \times 10^{-5} < 0,05$. ^dFcalc (275,15) > Ftab (5,14); valor-P $1,25 \times 10^{-6} < 0,05$. ^eFcalc (180,60) > Ftab (5,14); valor-P $4,36 \times 10^{-6} < 0,05$. ^fFcalc (48,15) > Ftab (5,14); valor-P 0,0002 < 0,05. ^gFcalc (712,25) > Ftab (5,14); valor-P $7,37 \times 10^{-8} < 0,05$. ^hFcalc (136,35) > Ftab (5,14); valor-P $9,97 \times 10^{-6} < 0,05$. ⁱFcalc (86,42) > Ftab (5,14); valor-P $3,77 \times 10^{-5} < 0,05$. ^jFcalc (118,79) > Ftab (5,14); valor-P $1,49 \times 10^{-5} < 0,05$.

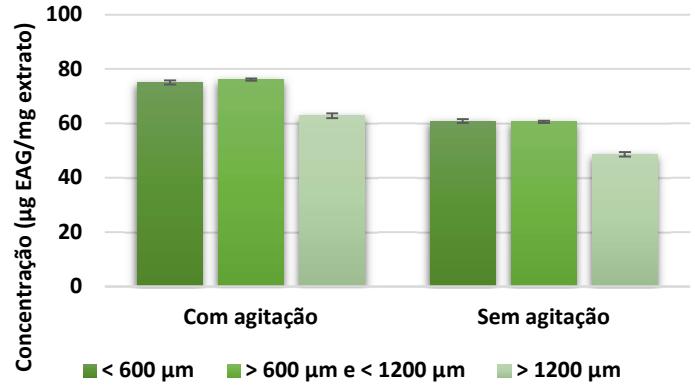
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 18. Resultados da avaliação da influência do tamanho de partícula e agitação no processo extrativo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.

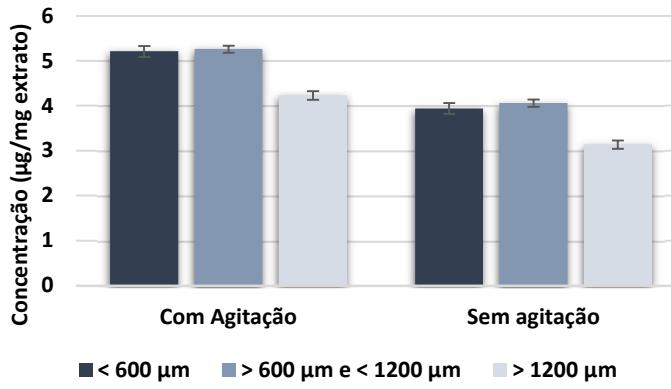
Flavonoides totais



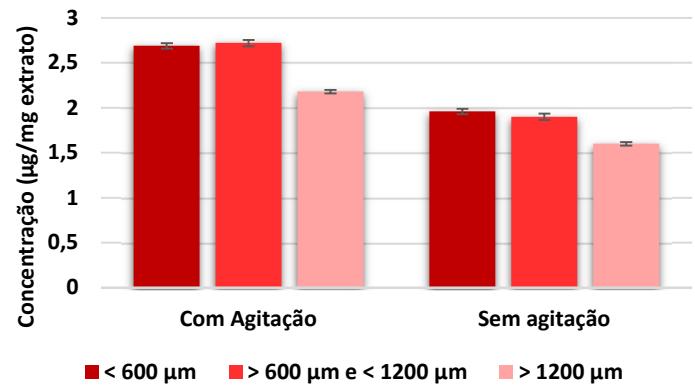
Compostos fenólicos totais



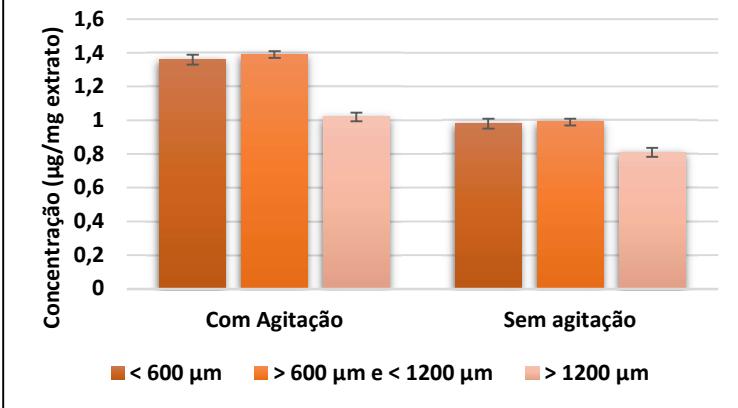
(-)-Epigallocatequina



(+)-Catequina



(-)-Epicatequina



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A avaliação dos dados obtidos neste parâmetro permite afirmar que o processo de extração submetido à agitação se mostrou mais eficaz que a maceração estática. O aumento da cinética das partículas que compõem a mistura favorece a maior interação entre solvente e droga vegetal, promovendo melhor capacidade extrativa diante de processos estáticos (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Em estudo realizado por Cardoso *et al.* (2017) utilizando as folhas da espécie *Alpinia zerumbert*, foi possível observar que processos extractivos dinâmicos como a percolação, marceração dinâmica e ultrassom, superaram os rendimentos de extração de compostos fenólicos totais obtidos pelo processo de maceração estática. Os tamanhos de partículas avaliados não apresentaram diferenças estatísticas significativas acerca do rendimento.

Após análise estatística dos dados por ANOVA *one way* seguido de pós-teste de Tukey, foi possível verificar que não existem diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$) para as classes de compostos quantificados nos intervalos que continham partículas $< 600 \mu\text{m}$ e $> 600 \mu\text{m}$ e $< 1200 \mu\text{m}$. Entretanto, extratos contendo partículas com tamanho médio superior a 1,2 mm, apresentaram decréscimo nos teores dos compostos analisados. Este comportamento foi observado tanto no grupo submetido à agitação, quanto no grupo estático, podendo-se inferir que o processo de agitação, individualmente, não é capaz de compensar a dificuldade de extração em partículas maiores.

Em estudo realizado por Rojo-Poveda *et al.* (2019) utilizando as cascas da semente de *Theobroma cacao* em diferentes tamanhos de partícula (250 – 500 μm , 500 – 1000 μm , 1000 – 2000 μm , 2000 – 4000 μm e $> 4000 \mu\text{m}$), foi possível observar que partículas de tamanho médio (500 – 1000 μm) apresentaram os maiores teores de extração de compostos fenólicos, flavonoides e taninos totais. Enquanto o intervalo com menor tamanho (250 – 500 μm) inviabilizou a técnica de extração devido à alta agregação de partículas, sendo descartado do estudo. Além disso, as dimensões superiores a 1000 μm apresentaram resultados decrescentes com o aumento gradativo do seu tamanho, culminando com os menores teores observados em partículas com $> 4000 \mu\text{m}$.

De acordo com Baccarin *et al.* (2014) o maior teor de extração do ácido myrsinólico B foi obtido a partir das cascas do caule de *R. ferruginea* por

maceração dinâmica em solvente hidroalcóolico e tamanho médio de partícula (500 – 1000 µm). Os valores de recuperação do marcador obtidos em partículas de 200 – 300 µm foram os menores observados independentemente do tipo de solvente ou tempo de extração empregados. Ao avaliar a extração do isoflavonoide daidzeína do material vegetal de *Glycine max*, foi possível observar maiores teores do marcador ao utilizar partículas contendo tamanho médio de 1200 µm, em maceração com solução hidroalcóolica a 70% de etanol e exposição por 6 horas (YULIANI *et al.*, 2019).

Resultados semelhantes foram observados por Ćujić *et al.* (2016) ao propor otimização do método de extração de compostos fenólicos totais e antocianinas dos frutos secos de *Aronia melanocarpa*. De acordo com os autores, os maiores teores dos compostos recuperados (27,7 mg EAG/g e 0,27%, respectivamente) foram obtidos utilizando tamanho de partícula de 750 µm em maceração com solução hidroalcóolica a 70% de etanol. Por fim, indicaram que a maceração é uma técnica simples e eficaz para a extração de compostos bioativos.

Ao avaliar a capacidade extrativa de fenólicos, flavonoides, taninos e cumarinas totais por diferentes métodos (maceração, decocção, micro-ondas, ultrassom e turbólise) e utilizando tamanho fixo de partícula 1200 µm das folhas e caule de *M. rigida*, foi possível observar não haver diferença estatística significativa (95%) entre os teores recuperados através das técnicas de maceração, micro-ondas e decocção para os materiais analisados (NERI, 2016).

Em estudo realizado por Makanjoula (2017), ao avaliar processos extractivos com as espécies *Camellia sinensis* e *Zingiber officinale* variando solvente extrator, tamanho de partícula, temperatura e empregando a maceração com agitação, foi possível observar que os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais extraídos foram obtidos ao empregar tamanho de partícula de 710 µm para as duas espécies, frente às de tamanho 425 µm e > 1180 µm. Para o teor de flavonoides totais, o solvente ideal foi o etanol, enquanto os compostos fenólicos totais foram extraídos em maior proporção ao utilizar água quente (60 – 90°C) na extração.

Em relação ao emprego de tamanhos de partículas de pequena dimensão < 350 - 400 µm, foi possível observar que o seu uso apresenta maior rendimento em técnicas que empregam pressão e temperatura no processo de extração,

como o fluido supercrítico. Em estudo realizado por Melo *et al.* (2017) utilizando as cascas de *Quercus cerris*, foi possível obter os maiores índices do triterpeno friedelina ao empregar partículas com tamanhos entre 177 – 243 μm submetidas à técnica de extração por fluido supercrítico, operando com CO_2 a 300 bar e 50 °C. De modo semelhante, ao avaliar o processo de extração de ácidos graxos insaturados das sementes da espécie *Rosa canina*, Jahongir *et al.* (2019) obteve o maior rendimento empregando CO_2 a 30 Mpa, 50°C e partículas com tamanho inferior a 277 μm .

Diante dos resultados relatados, não parece haver um consenso absoluto sobre as condições utilizadas para processos extractivos. Dessa forma, o processo de extração ideal deve combinar fatores como natureza da droga empregada, técnica extractiva, proporção solvente:droga, temperatura, tamanho de partícula e tempo de interação de modo individualizado, destacando a importância deste estudo. Em relação à extração com material vegetal das folhas de *M. obtusifolia*, as condições ideais foram definidas como extração por maceração utilizando etanol (96%) com partículas contendo tamanho médio no intervalo de > 600 μm e < 1200 μm e empregando agitação constante para promover o aumento da interação entre droga x solvente, favorecendo a extração dos componentes de interesse.

5.2 Controle de qualidade do material vegetal

5.2.1 Determinação de água em drogas vegetais

Os resultados obtidos através da metodologia farmacopeica “Determinação da perda de água por dessecação” (gravimétrico) são apresentados na Tabela 12 e foram dispostos no Gráfico 2.

Tabela 12. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecação” ($n = 3$), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.

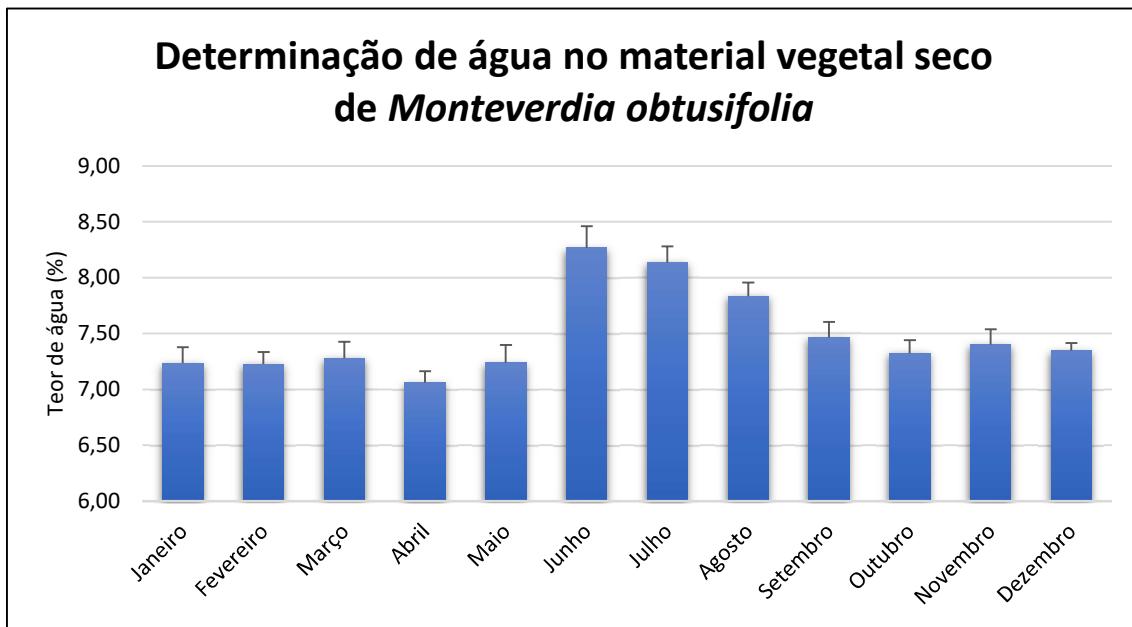
Método Gravimétrico	Resultados ($n=3$)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	7,36% 7,27%	7,24%	0,14	2,00

	7,08%			
	7,11%			
Fevereiro	7,26%	7,23%	0,11	1,48
	7,32%			
	7,17%			
Março	7,45%	7,28%	0,15	2,05
	7,22%			
	6,96%			
Abril	7,05%	7,06%	0,10	1,44
	7,17%			
	7,41%			
Maio	7,09%	7,24%	0,16	2,21
	7,21%			
	8,09%			
Junho	8,23%	8,27%	0,20	2,39
	8,48%			
	7,98%			
Julho	8,15%	8,13%	0,15	1,79
	8,28%			
	7,70%			
Agosto	7,92%	7,84%	0,12	1,54
	7,89%			
	7,31%			
Setembro	7,59%	7,46%	0,14	1,90
	7,49%			
	7,22%			
Outubro	7,31%	7,33	0,12	1,58
	7,45%			
	7,26%			
Novembro	7,42%	7,40%	0,14	1,86
	7,53%			
	7,29%			
Dezembro	7,42%	7,35%	0,07	0,92

	7,33%
Média anual	7,49%
	0,13

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 2. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecação” (n = 3), de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O parâmetro perda por dessecação constitui um importante item para avaliar a qualidade de matérias-primas vegetais, pois o excesso de água possibilita a continuidade do metabolismo vegetal com ação enzimática e/ou hidrólise de compostos químicos presentes, bem como favorece o desenvolvimento de fungos e bactérias (BARNI *et al.*, 2009; VUUREN *et al.*, 2014; DAO *et al.*, 2018).

Os resultados encontrados para a técnica de perda por dessecação (mínimo 7,06% ± 0,10 e máximo 8,27% ± 0,20) apresentaram valores condizentes às perdas de água no material vegetal, visto que para a espécie *Monteverdia ilicifolia*, pertencente ao mesmo gênero da espécie em estudo, o valor máximo aceito pela Farmacopeia Brasileira 6^a edição em sua monografia é de 12% de água (BRASIL, 2019b). O limite máximo de teor de água permitido para drogas vegetais é de 14% (BRASIL, 2000; BRASIL, 2019b).

Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (23,69) foi superior ao valor de F_{critico} (2,21), sugerindo que há diferença estatística entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. Confirmado esta teoria, o valor-P foi de $3,06 \times 10^{-10}$, conforme observado na Tabela 13.

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) dos teores de água da droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F critico
Entre grupos	4,865097222	11	0,442281566	23,6936553	3,06E-10	2,216309
Dentro dos grupos	0,448	24	0,018666667			
Total	5,313097222	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata

Fonte: ARAÚJO, 2021.

As diferenças observadas nos teores de água podem estar relacionadas ao grande índice pluviométrico registrado no inverno do ano de 2017 entre os meses de junho e agosto. Este comportamento também foi observado por Oliveira e colaboradores (1998) onde, provavelmente, esteja relacionado às diferenças em termos de umidade relativa do ar na época de cada teste, visto que as amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos de secagem e armazenamento. Esta condição modifica este parâmetro podendo incorporar de 10-30% de umidade às drogas vegetais armazenadas.

A análise dos dados do pós-teste de Tukey, demonstrou as diferenças entre os resultados encontrados nos meses de Janeiro a Maio de 2017 com os meses de Junho a Agosto de 2017. Os resultados de Agosto a Dezembro com os encontrados em Junho. Também diferiram entre si os valores encontrados de Setembro a Dezembro com o mês de Julho e os valores de Outubro a Dezembro com o valor encontrado para o mês de Agosto. Os valores estão apresentados na Tabela 14 extraída do software estatístico Past.

Tabela 14. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de água em drogas vegetais.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		1	1	0,8989	1	0,0001429	0,0001432	0,0008788	0,6699	0,9994	0,9283	0,9967
FEV	0,08452		1	0,9192	1	0,0001429	0,0001431	0,000776	0,6327	0,9989	0,9094	0,9945
MAR	0,5494	0,6339		0,7062	1	0,0001429	0,0001440	0,002097	0,8759	1	0,9914	1
ABR	2,24	2,155	2,789		0,8989	0,0001429	0,0001429	0,0001527	0,04901	0,4476	0,1463	0,3477
MAI	0	0,08452	0,5494	2,24		0,0001429	0,0001432	0,0008788	0,6699	0,9994	0,9283	0,9967
JUN	13,06	13,14	12,51	15,3	13,06		0,9871	0,02901	0,000148	0,0001430	0,0001438	0,000143
JUL	11,41	11,49	10,86	13,664	11,41	1,648		0,2889	0,000273	0,0001469	0,0001727	0,0001498
AGO	7,606	7,691	7,057	9,846	7,606	5,45	3,803		0,8622	0,0055830	0,02713	0,008484
SET	2,874	2,958	2,324	5,113	2,874	10,18	8,536	4,733		0,9812	1	0,9945
OUT	1,141	1,225	0,5916	3,381	1,141	11,92	10,270	6,465	1,733		0,9999	1
NOV	2,113	2,197	1,564	4,353	2,113	10,94	9,297	5,494	0,7606	0,9719		1
DEZ	1,395	1,479	0,8452	3,634	1,395	11,66	10,020	6,212	1,479	0,2535	0,7184	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Estes achados indicam que o fator sazonal, índice pluviométrico, pode influenciar os resultados obtidos para a determinação do teor de água na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia*.

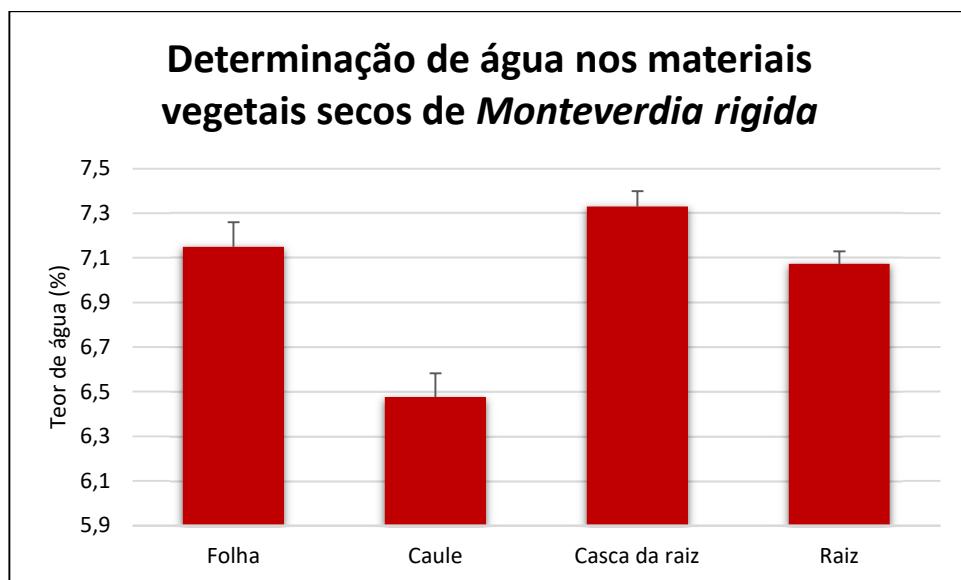
Tabela 15. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecção” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletada no mês de junho de 2018.

Método Gravimétrico	Resultados (n=3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
	7,13%			
Folhas	7,05%	7,15%	0,11	1,55
	7,27%			
	6,36%			
Caule	6,57%	6,48%	0,11	1,65
	6,50%			
	7,26%			
Casca da raiz	7,40%	7,33%	0,07	0,95
	7,33%			
	7,01%			
Raiz	7,12%	7,07%	0,06	0,81
	7,09%			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A avaliação do teor de água dos materiais vegetais de *M. rigida* forneceu os seguintes resultados (folhas – 7,15 % ± 0,11), (caule – 6,48 % ± 0,11), (casca da raiz – 7,33 % ± 0,07) e (raiz – 7,07 % ± 0,06) (Gráfico 3). Estes valores estão em acordo com o limite preconizado pelo compêndio oficial (BRASIL, 2019b).

Gráfico 3. Teores de água obtidos através da metodologia “Determinação da perda por dessecação” (n = 3) dos materiais vegetais secos de *Monteverdia rigida*.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Ao avaliar a variabilidade entre as amostras por meio do teste de ANOVA one way seguido de teste complementar de Tukey, foi possível observar que o valor calculado de F (51,35) foi superior ao valor de F_{critico} (4,06), sugerindo que existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P encontrado foi de 1,43x10⁻⁵ inferior ao p<0,05, confirmando a diferença entre as amostras, conforme observado na Tabela 16. O pós-teste de Tukey apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 17). Estas diferenças justificam-se pela diferente composição das partes avaliadas (ALAM; SAQIB, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) da determinação de teor de água das diferentes partes da droga vegetal seca de *Monteverdia rigida*.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,231292	3	0,410431	51,35732	1,43E-05	4,066181
Dentro dos grupos	0,063933	8	0,007992			

ANOVA

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 17. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação do teor de água das diferentes partes de *M. rigida*.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,0002726	0,141	0,7268
Caule	13,05		0,0002333	0,0003643
Casca Raiz	3,488	16,53		0,03234
Raiz	1,485	11,56	4,973	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os teores de água referentes às folhas dos materiais vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* para o mês de Junho, foram comparadas para verificação de equivalência por teste t. Foi possível observar que $t_{calculado} (14,16) > t_{crítico} (4,3)$, demonstrando haver diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P ($0,005 < 0,05$) confirma as diferenças encontradas. As disparidades observadas podem estar relacionadas aos diferentes índices pluviométricos referentes às localidades de coleta.

5.2.2 Ensaio limite de metais pesados

A determinação de metais pesados em drogas vegetais constitui exigência sanitária presente na legislação brasileira e deve apresentar valores inferiores a 10 ppm (BRASIL, 2014a). Estes metais podem ser provenientes do solo, da água de irrigação ou da atmosfera e aumentam com a poluição ambiental. A proximidade de estradas pode favorecer a contaminação do solo pelo arraste de poluentes promovidos pelas chuvas (FREIRE, 2005).

O ensaio limite de metais pesados consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão. O ensaio é semiquantitativo, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra. Os resultados obtidos neste experimento a partir do material vegetal seco de *Monteverdia obtusifolia* de janeiro a dezembro de 2017 e as drogas vegetais secas equivalentes às folhas, caule, cascas da raiz e raiz de *Monteverdia rigida* demonstraram que os materiais analisados apresentaram níveis aceitáveis de metais pesados, abaixo de 10 ppm, ao serem comparados ao material de referência. Os resultados obtidos através da metodologia farmacopeica “Ensaio limite de metais pesados” são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados obtidos através da metodologia “Ensaio limite de metais pesados”, nas drogas vegetais secas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral, coletadas nos meses de janeiro a dezembro de 2017 e *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletada em junho de 2018.

Espécie	Material analisado	Ensaio limite de metais pesados	Resultados
<i>Monteverdia obtusifolia</i>	Folhas	Janeiro/17	< 10 ppm
		Fevereiro/17	< 10 ppm
		Março/17	< 10 ppm
		Abril/17	< 10 ppm
		Maio/17	< 10 ppm
		Junho/17	< 10 ppm
		Julho/17	< 10 ppm
		Agosto/17	< 10 ppm
		Setembro/17	< 10 ppm
		Outubro/17	< 10 ppm
		Novembro/17	< 10 ppm
		Dezembro/17	< 10 ppm
Média anual		< 10 ppm	
<i>Monteverdia rigida</i>	Folhas	<10 ppm	
	Caule	Junho/18	
	Cascas da raiz	<10 ppm	
	Raiz	<10 ppm	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.2.3 Densidade aparente de sólidos

Os resultados obtidos através do método farmacopeico de “Determinação de densidade aparente de sólidos” para a droga vegetal de *Monteverdia obtusifolia* Mart. estão apresentados na Tabela 19 e foram dispostos no Gráfico 4.

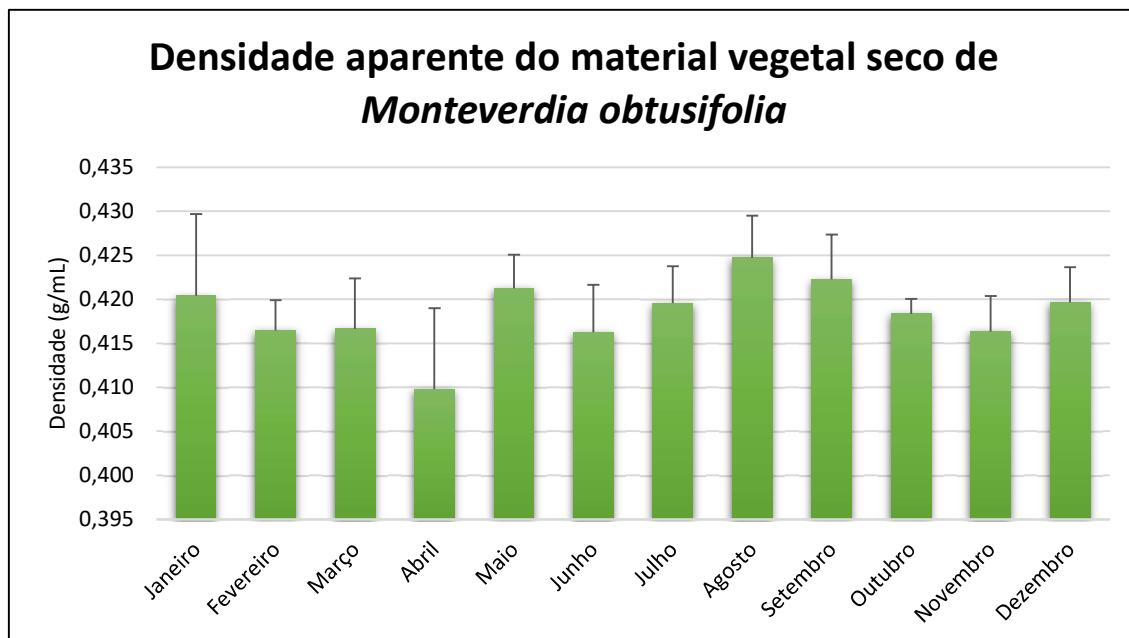
Tabela 19. Densidades aparente obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* Mart coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.

Densidade aparente de sólidos	Resultados (n=3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
	0,429 g/mL			
Janeiro	0,421 g/mL 0,411 g/mL	0,420 g/mL	0,01	2,21
	0,416 g/mL			
Fevereiro	0,420 g/mL 0,414 g/mL	0,416 g/mL	0,003	0,83
	0,410 g/mL			
Março	0,421 g/mL 0,418 g/mL	0,417 g/mL	0,006	1,39
	0,400 g/mL			
Abril	0,418 g/mL 0,411 g/mL	0,410 g/mL	0,009	2,24
	0,425 g/mL			
Maio	0,421 g/mL 0,418 g/mL	0,421 g/mL	0,004	0,91
	0,410 g/mL			
Junho	0,419 g/mL 0,420 g/mL	0,416 g/mL	0,005	1,29
	0,422 g/mL			
Julho	0,422 g/mL 0,415 g/mL	0,420 g/mL	0,004	1,00
	0,430 g/mL			
Agosto	0,425 g/mL 0,420 g/mL	0,425 g/mL	0,005	1,14
	0,427 g/mL			
Setembro	0,417 g/mL 0,423 g/mL	0,422 g/mL	0,005	1,21
	0,417 g/mL			
Outubro	0,417 g/mL	0,418 g/mL	0,002	0,41

	0,420 g/mL			
	0,418 g/mL			
	0,412 g/mL			
Novembro	0,420 g/mL	0,416 g/mL	0,004	0,97
	0,416 g/mL			
	0,416 g/mL			
Dezembro	0,424 g/mL	0,420 g/mL	0,004	0,95
	0,419 g/mL			
Média anual	0,418 g/mL		0,005	1,21

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 4. Densidades aparente obtidas através da metodologia “Determinação de densidade aparente” (n = 3), de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A densidade aparente consiste em um importante parâmetro para o controle do processo de extração de materiais vegetais, que podem ser usados como base para prever propriedades de preenchimento e compactação, bem como fornece informações importantes sobre o processo de secagem de extratos vegetais (FONSECA, 2009).

Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA one way seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (0,999) foi inferior ao valor de F_{critico} (2,21), sugerindo que não existem

diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P encontrado foi de 0,474 superior ao $p<0,05$, confirmado a similaridade entre as amostras, conforme observado na Tabela 10 (p. 63). O pós-teste de Tukey não apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Figura 6, p. 63).

Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) da densidade aparente da droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,000274306	11	2,49369E-05	0,999696295	0,474596064	2,21630865
Dentro dos grupos	0,000598667	24	2,49444E-05			
Total	0,000872972	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 21. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de densidade aparente de sólidos.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		0,9985	0,9968	0,9968	1	0,9968	1	0,9887	1	1	0,9938	1
FEV	1,272		1	1	0,9887		1	0,9998	0,6627	0,9547	1	1
MAR	1,387	0,1156		1	0,9811		1	0,9994	0,6116	0,9347	1	1
ABR	1,387	0,1156	0		0,9811		1	0,9994	0,6116	0,9347	1	1
MAI	0,3468	1,618	1,734	1,734		0,9811		1	0,9985	1	0,9998	0,97
JUN	1,387	0,1156	0	0	1,734			0,9994	0,6116	0,9347	1	1
JUL	0,2312	1,04	1,156	1,156	0,578	1,156			0,97	0,9999	1	0,9985
AGO	1,618	2,89	3,006	3,006	1,272	3,006	1,85		0,9999	0,8794	0,5602	0,97
SET	0,6936	1,965	2,081	2,081	0,3468	2,081	0,9248	0,9248		0,9968	0,9097	0,9999
OUT	0,6936	0,578	0,6936	0,6936	1,04	0,6936	0,4624	2,312	1,387		1	1
NOV	1,503	0,2312	0,1156	0,1156	1,85	0,1156	1,272	3,121	2,196	0,8092		0,9985
DEZ	0,2312	1,04	1,156	1,156	0,578	1,156	0	1,85	0,9248	0,4624	1,272	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os dados de densidade referentes aos materiais vegetais de *M. rigida* estão apresentados na Tabela 22.

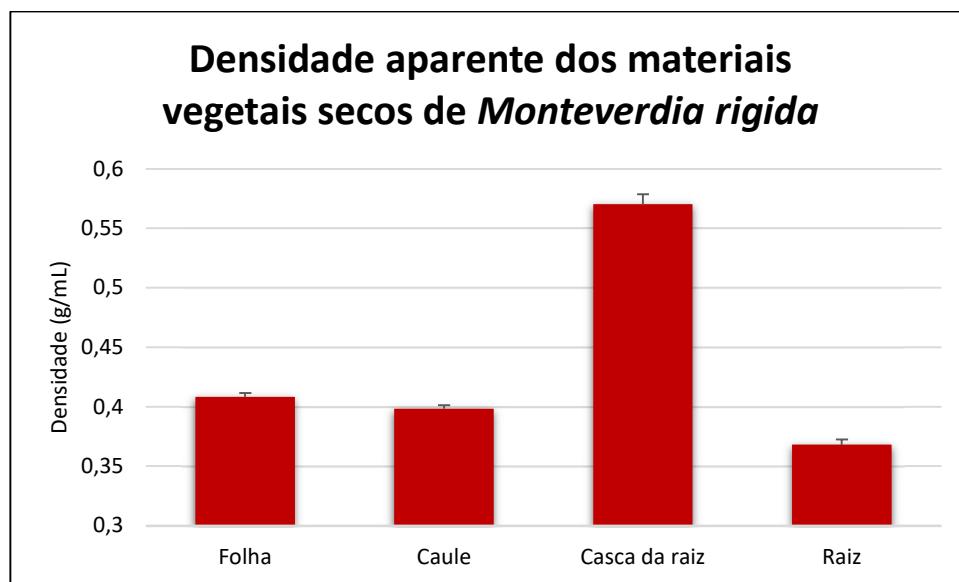
Tabela 22. Densidades aparentes obtidas através da metodologia para “Determinação de densidade aparente de sólidos” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletada no mês de junho de 2018.

Densidade aparente	Resultados (n=3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Folhas	0,407 g/mL			
	0,412 g/mL	0,408 g/mL	0,003	0,79
	0,406 g/mL			
Caule	0,399 g/mL			
	0,395 g/mL	0,398 g/mL	0,003	0,77
	0,401 g/mL			
Casca da Raiz	0,579 g/mL			
	0,562 g/mL	0,570 g/mL	0,008	1,49
	0,570 g/mL			
Raiz	0,369 g/mL			
	0,363 g/mL	0,368 g/mL	0,005	1,25
	0,372 g/mL			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

As densidades aparentes referentes aos materiais vegetais de *M. rigida* permitiram a verificação dos seguintes resultados para (folhas – 0,408 g/mL \pm 0,003), (caule – 0,398 g/mL \pm 0,003), (casca da raiz – 0,570 g/mL \pm 0,008) e (raiz – 0,368 g/mL \pm 0,06) (Gráfico 5). É importante destacar a elevada densidade da casca da raiz e as menores anotações para o caule e o cerne da raiz, estes valores podem estar relacionados aos diferentes teores de água, composição química e deposição de lignina.

Gráfico 5. Densidades aparentes obtidas através da metodologia “Determinação de densidade aparente” ($n = 3$) dos materiais vegetais de *Monteverdia rigida*.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os valores obtidos para o parâmetro de densidade aparente do material vegetal de *M. rigida* foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (879,76) foi superior ao valor de $F_{\text{crítico}}$ (4,06), sugerindo que existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor- P encontrado foi de $2,05 \times 10^{-10}$ inferior ao $p < 0,05$, confirmando a diferença entre as amostras, conforme observado na Tabela 23. O pós-teste de Tukey apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 24).

Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) da densidade aparente da droga vegetal seca de *Monteverdia rigida* Mart.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor- P	$F_{\text{crítico}}$
Entre grupos	0,07456	3	0,024853	879,767	2,05E-10	4,066181
Dentro dos grupos	0,000226	8	2,82E-05			
Total	0,074786	11				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 24. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro densidade aparente da droga vegetal seca de *Monteverdia rigida* Mart.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,1762	0,000231	0,00027
Caule	3,259		0,000231	0,000697
Casca Raiz	52,79	56,05		0,000231
Raiz	13,14	9,885	65,94	

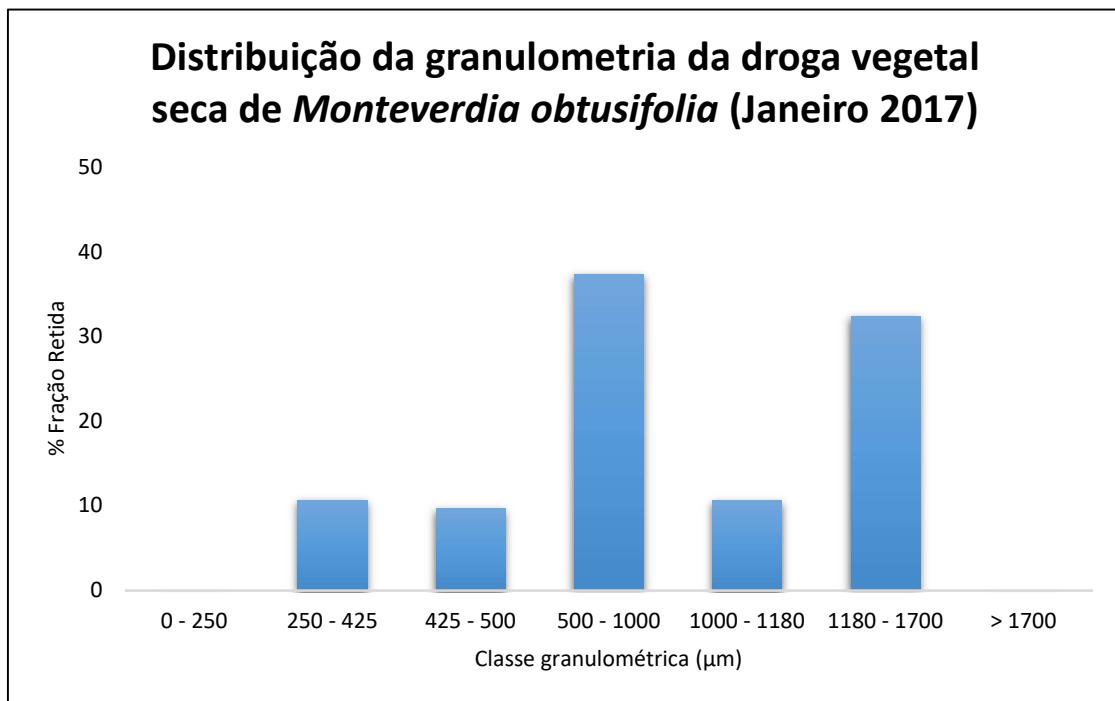
Fonte: ARAÚJO, 2021.

As densidades das folhas de *M. obtusifolia* e *M. rigida* para o mês de Junho, foram comparadas para verificação de equivalência por teste t. Foi possível observar que $t_{calculado}$ (2,48) < $t_{crítico}$ (4,3), demonstrando não haver diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P (0,13 > 0,05) confirma a validade do teste proposto.

5.2.4 Determinação da granulometria de pós

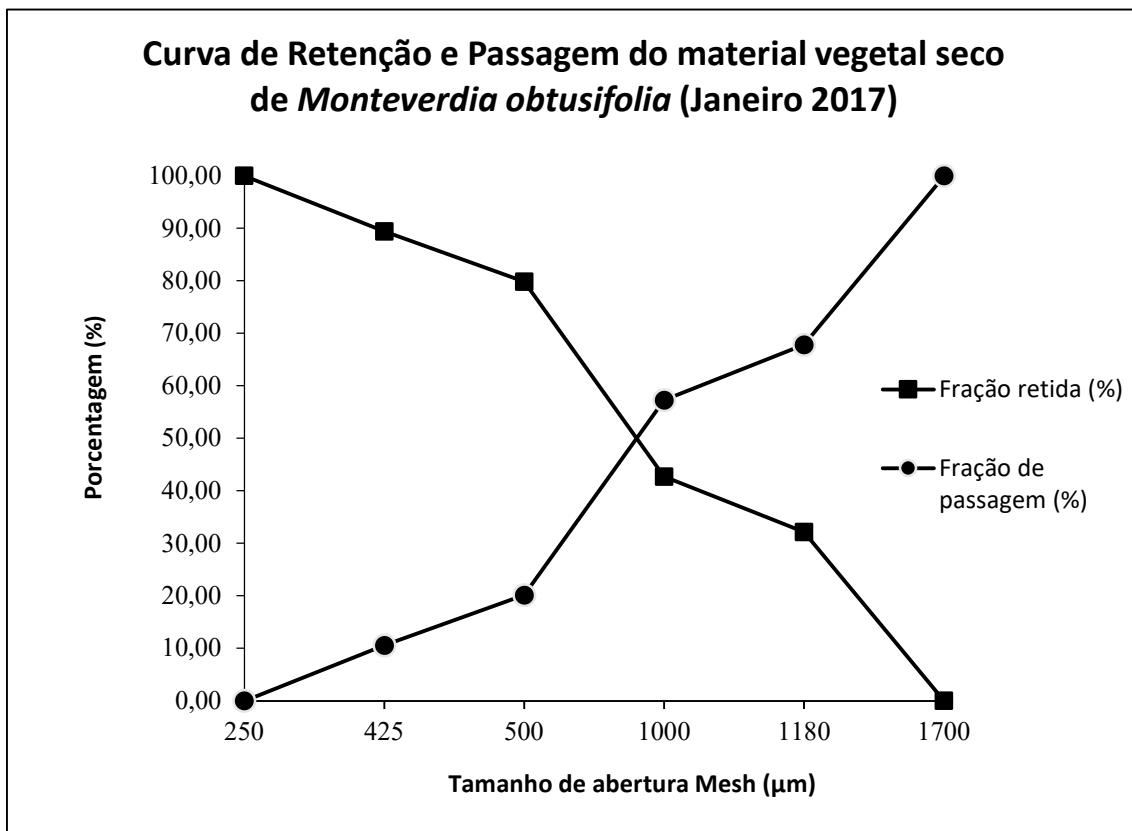
Os resultados obtidos através do método farmacopeico de “Determinação da granulometria de pós” para a droga vegetal de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral estão dispostos nos Gráficos 6 a 29, referentes aos pós obtidos entre os meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

Gráfico 6. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Janeiro 2017).



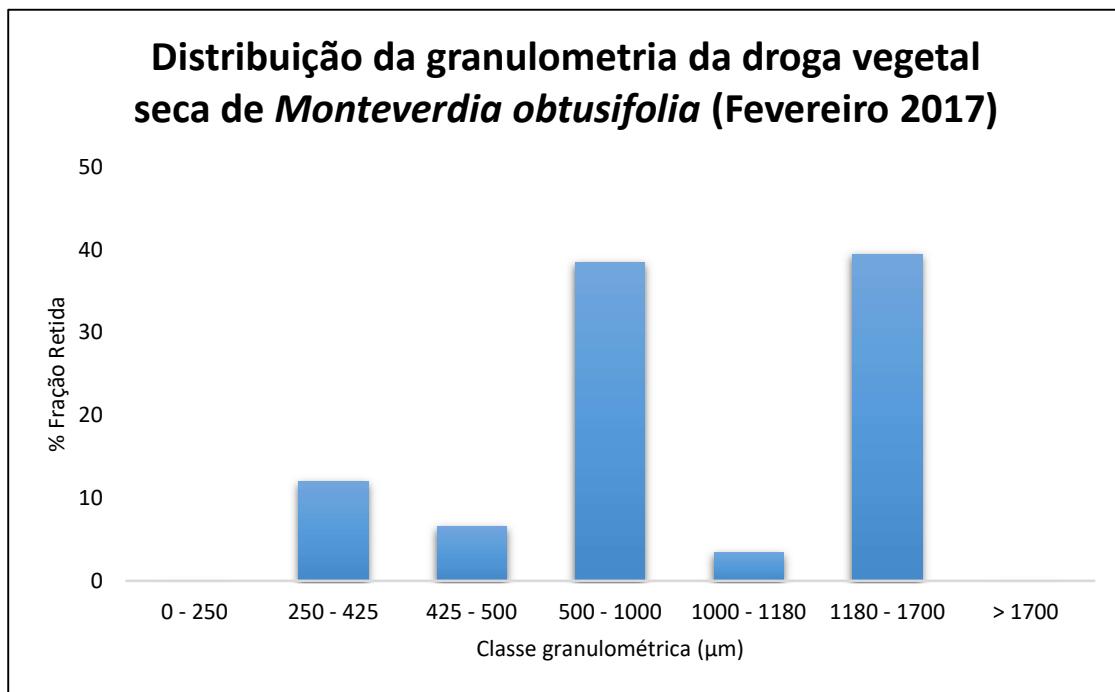
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 7. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Janeiro).



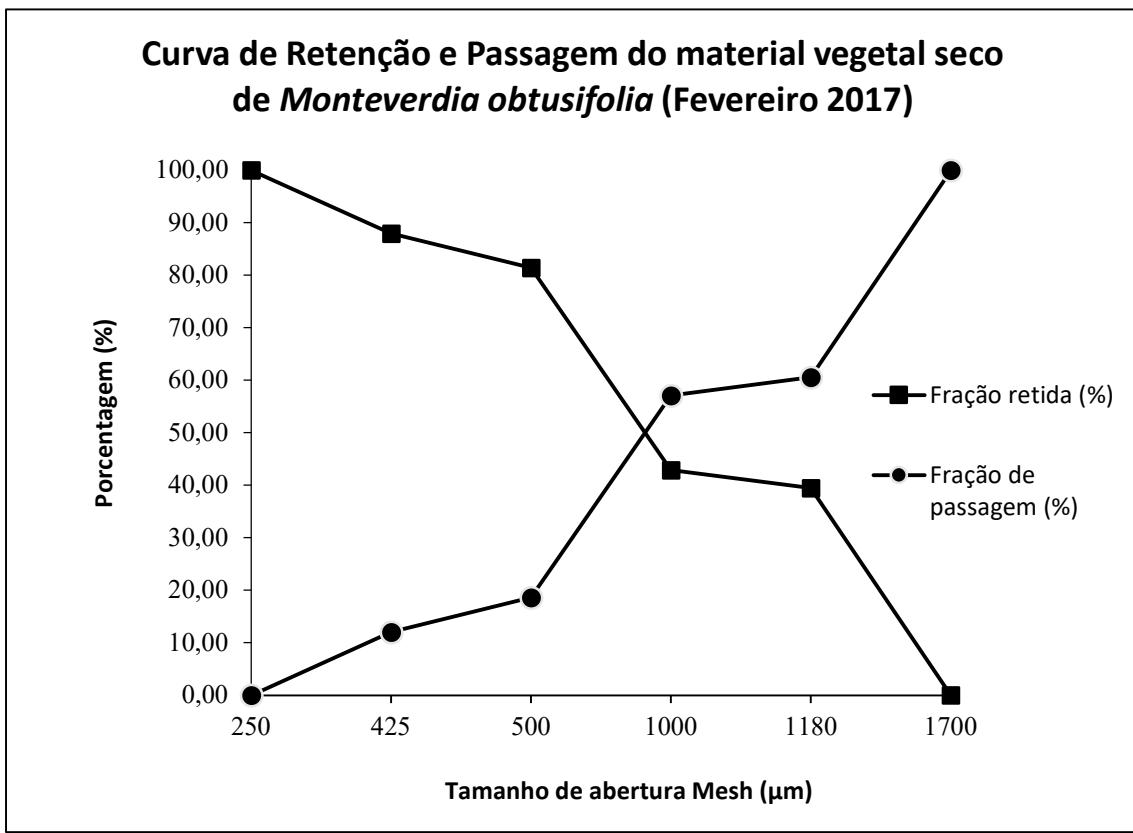
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 8. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Fevereiro 2017).



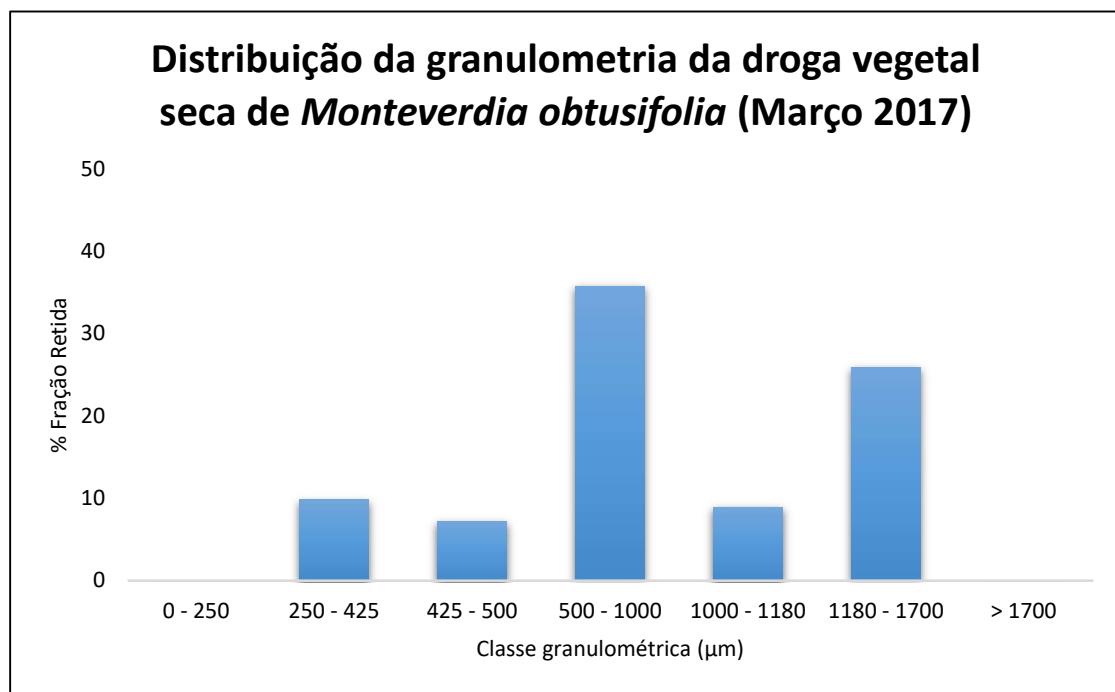
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 9. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Fevereiro).



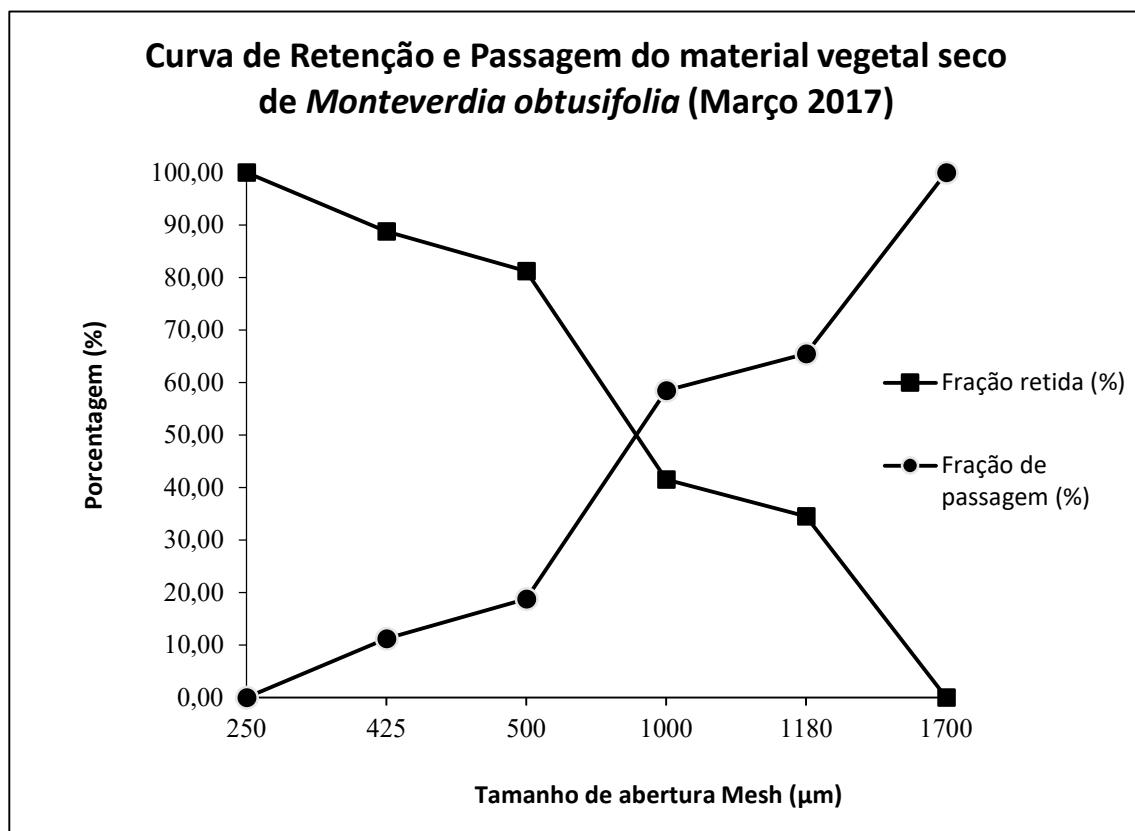
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 10. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Março 2017).



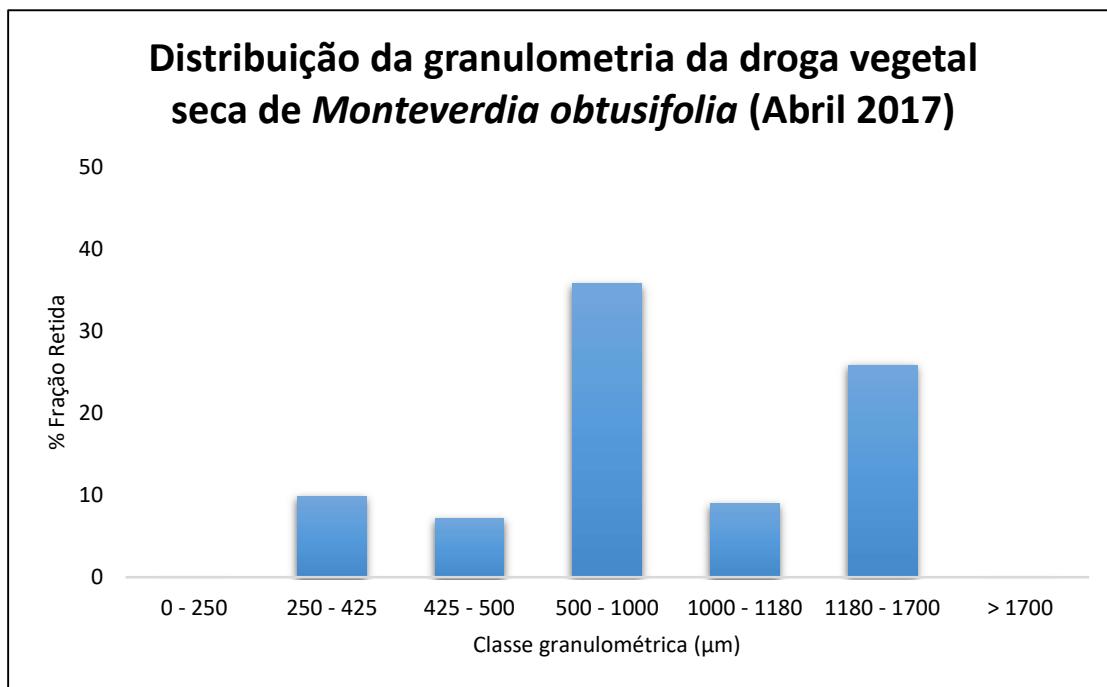
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 11. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Março).



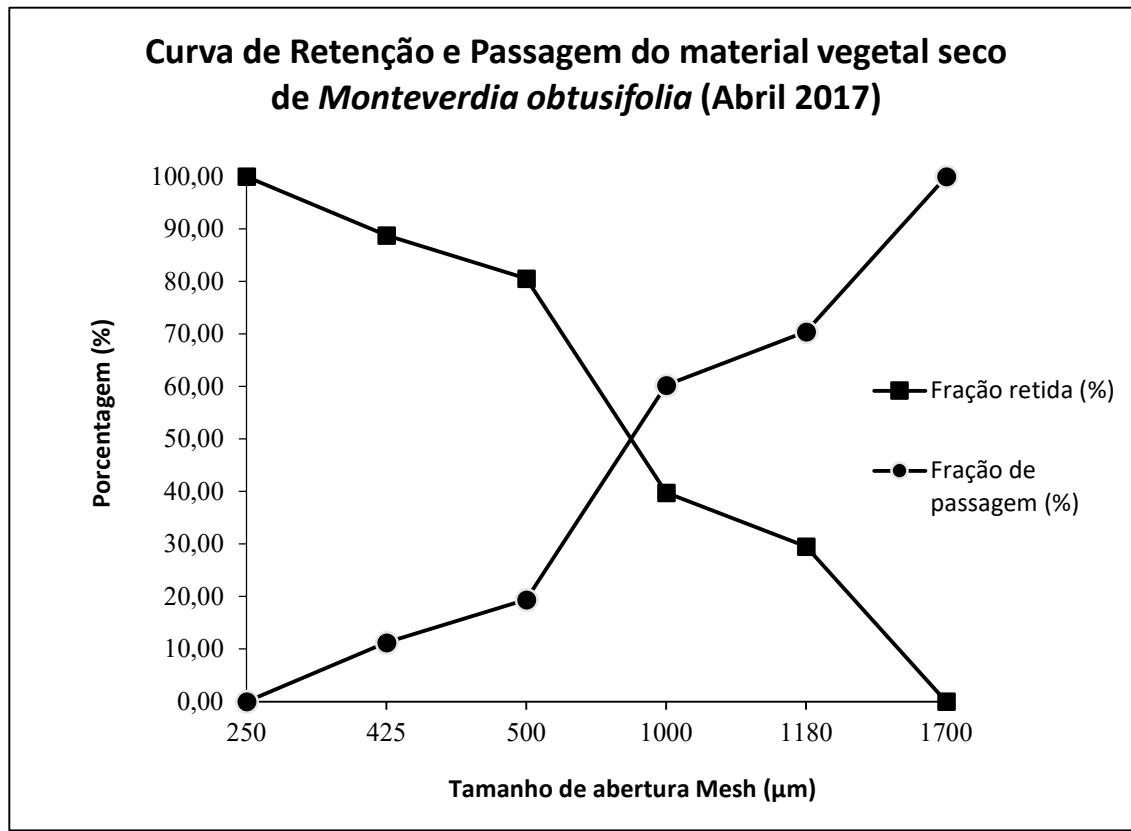
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 12. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Abril 2017).



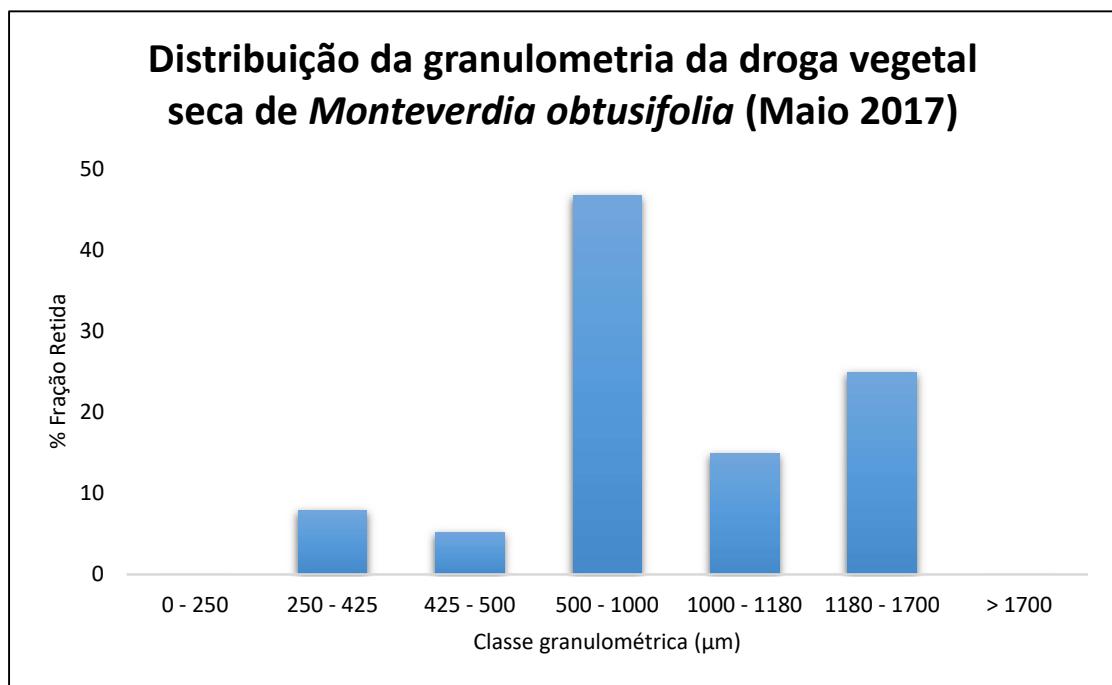
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 13. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Abril).



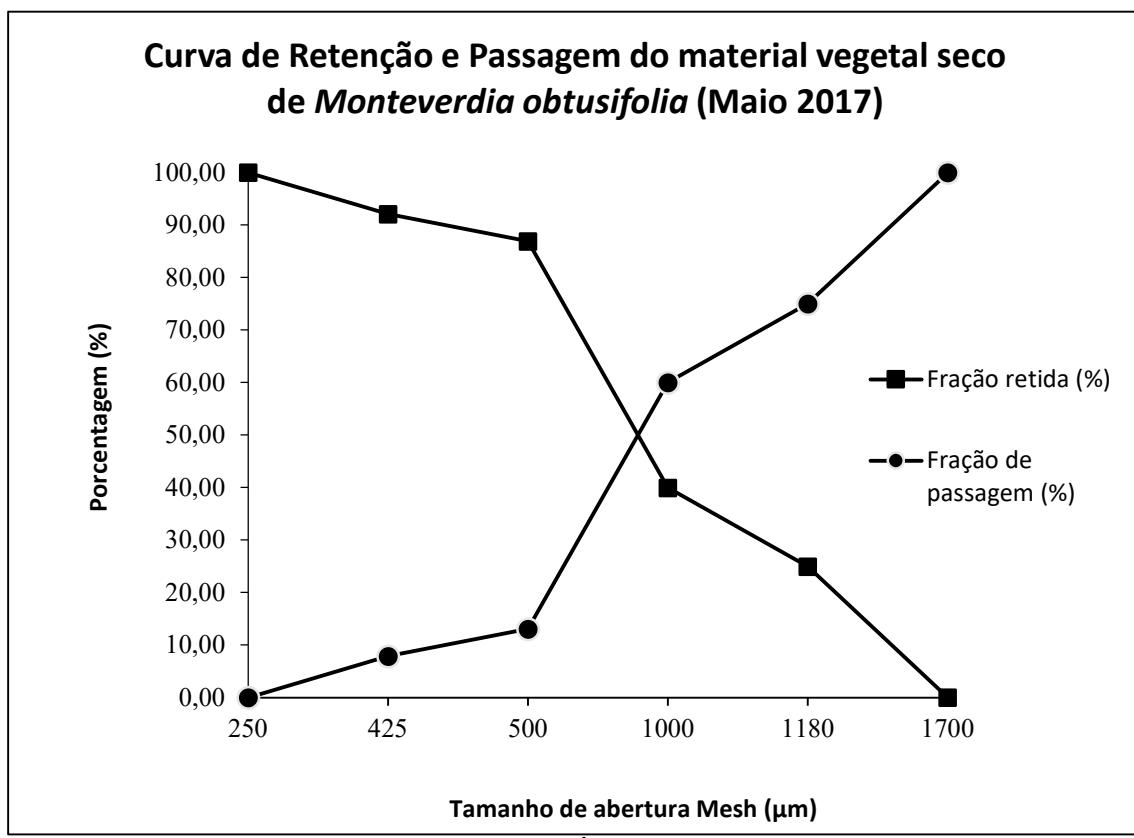
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 14. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Maio 2017).



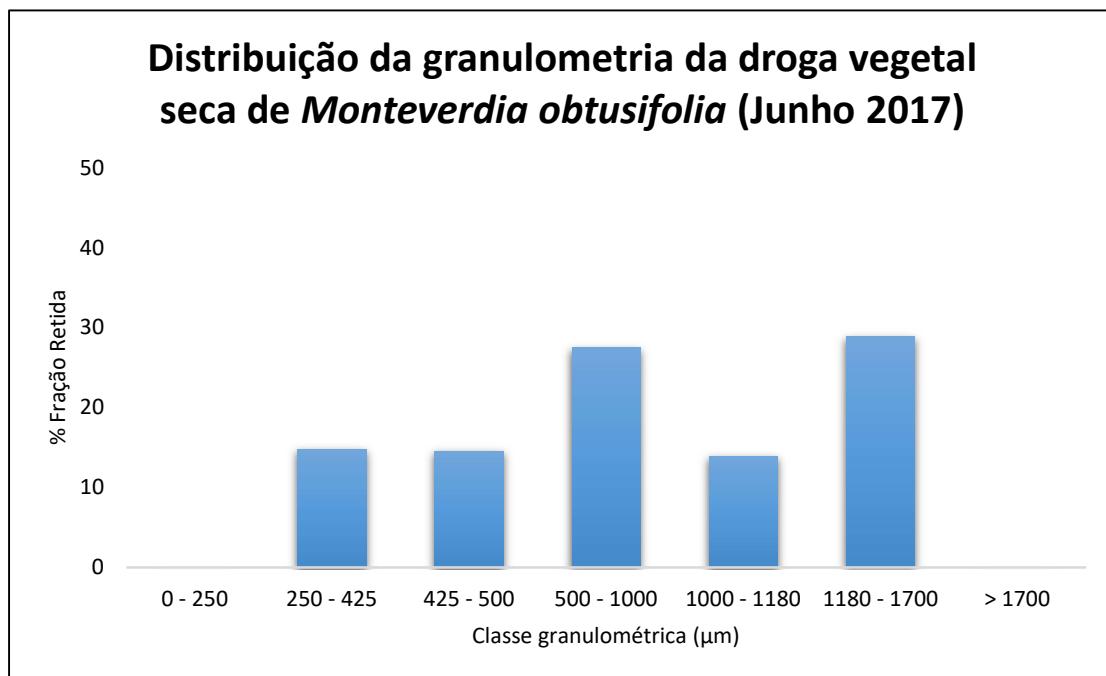
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 15. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Maio).



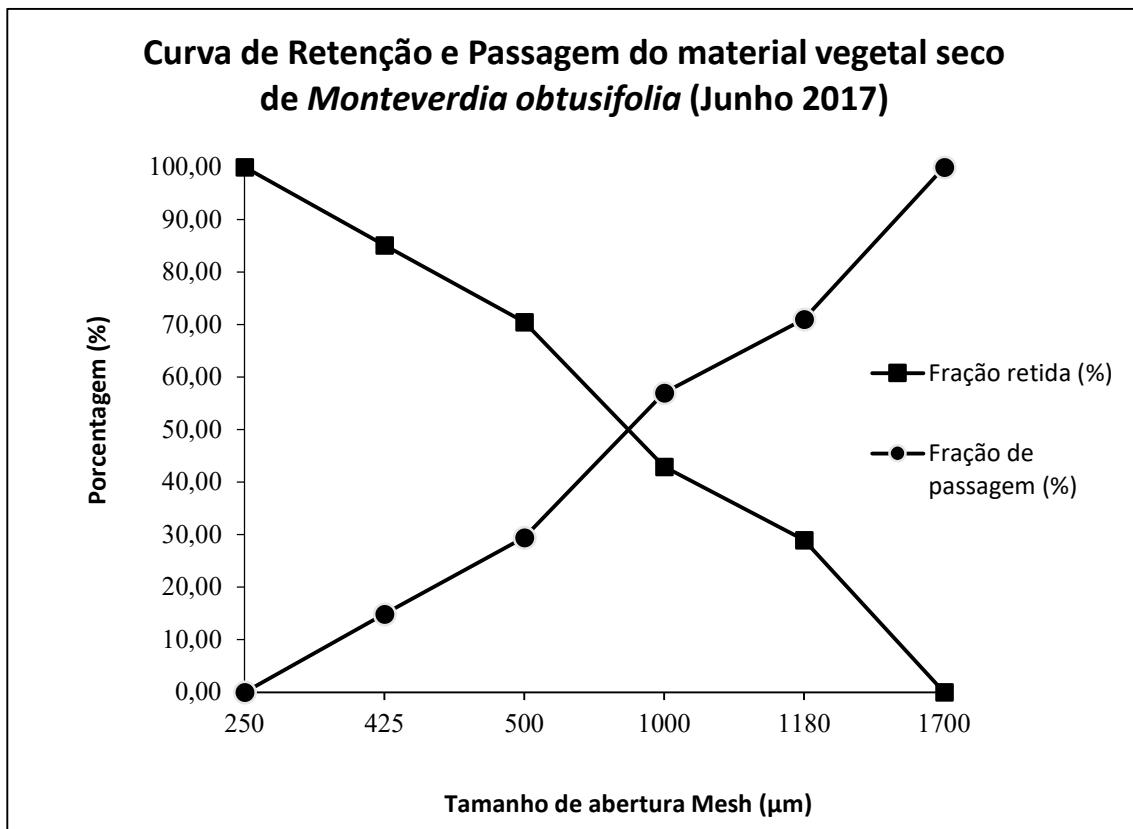
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 16. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Junho 2017).



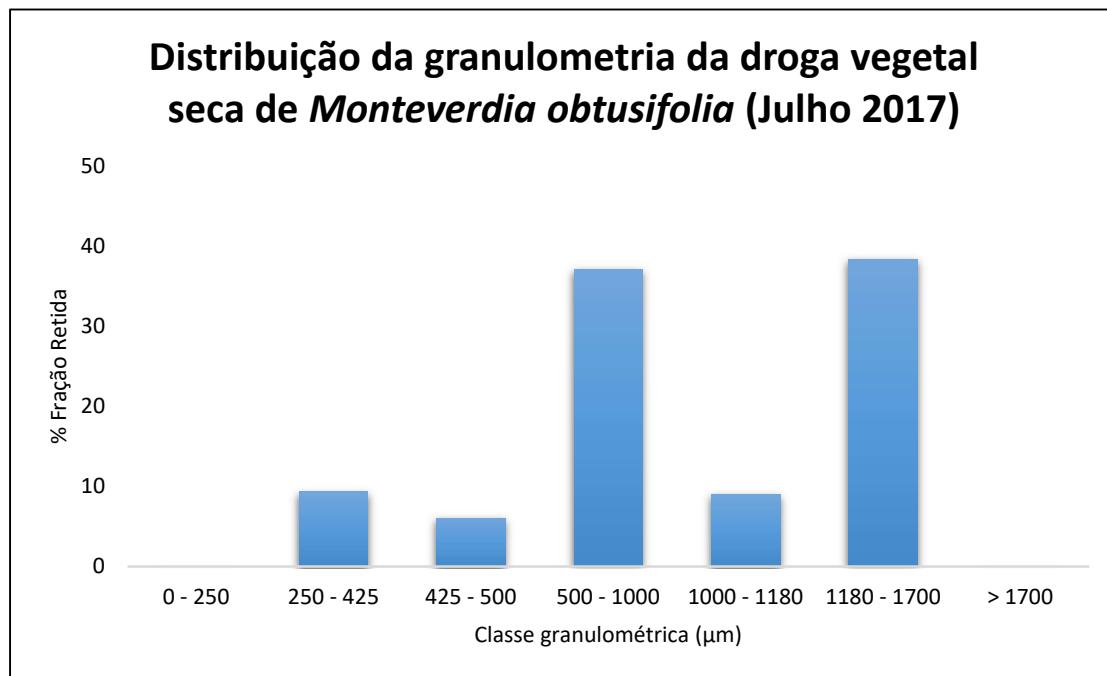
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 17. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Junho 2018).



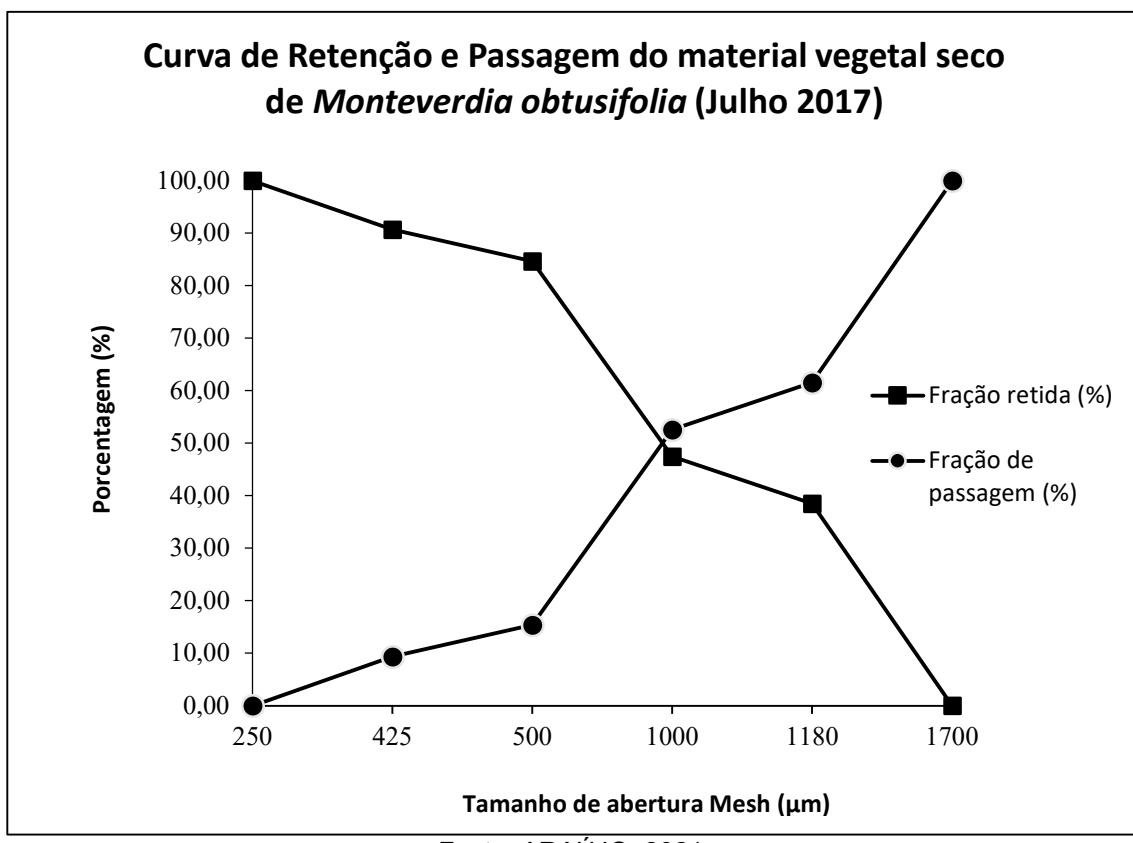
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 18. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Julho 2017).



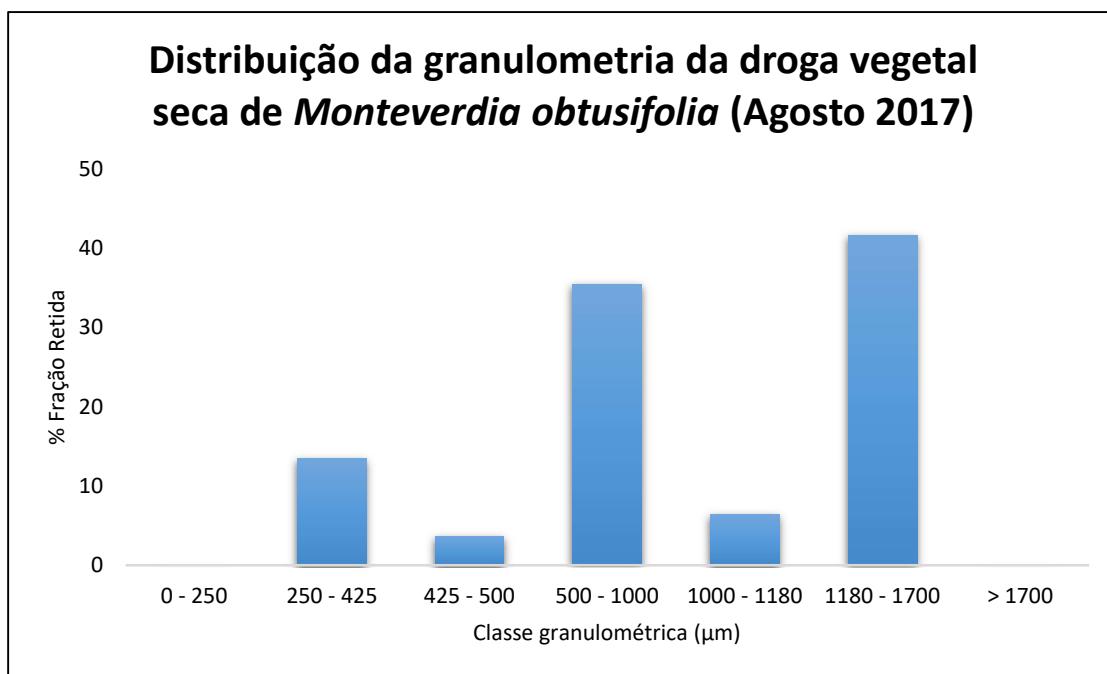
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 19. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Julho).



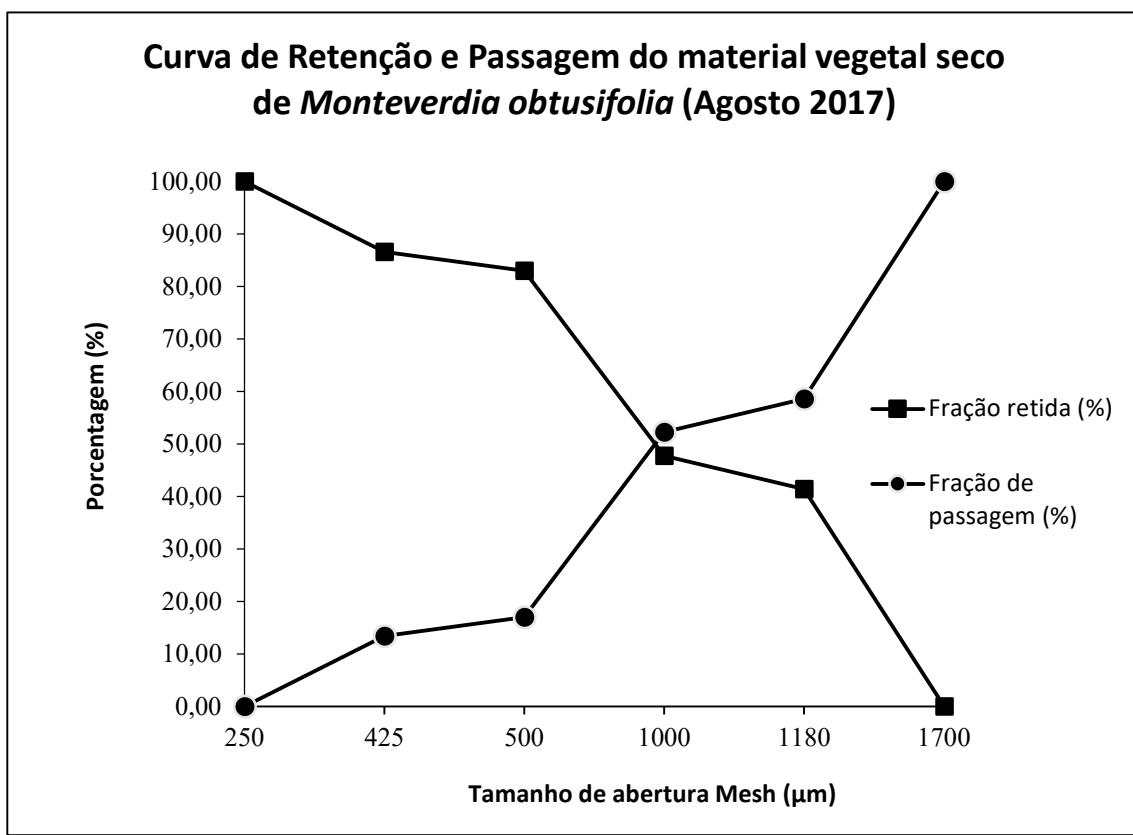
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 20. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Agosto 2017).



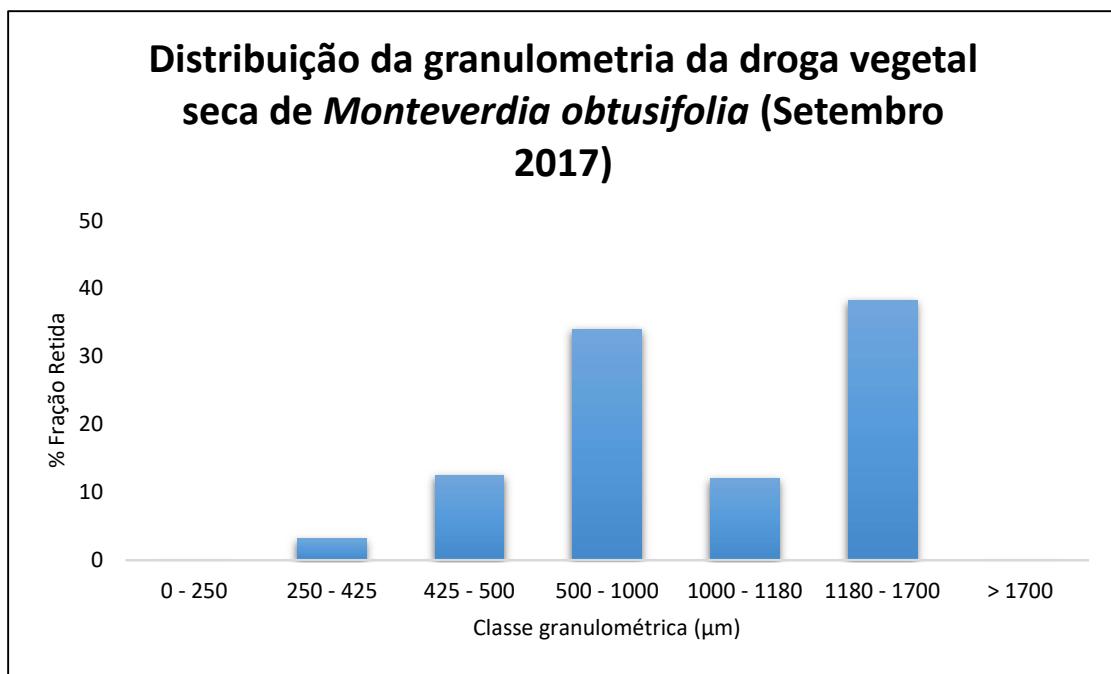
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 21. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Agosto).



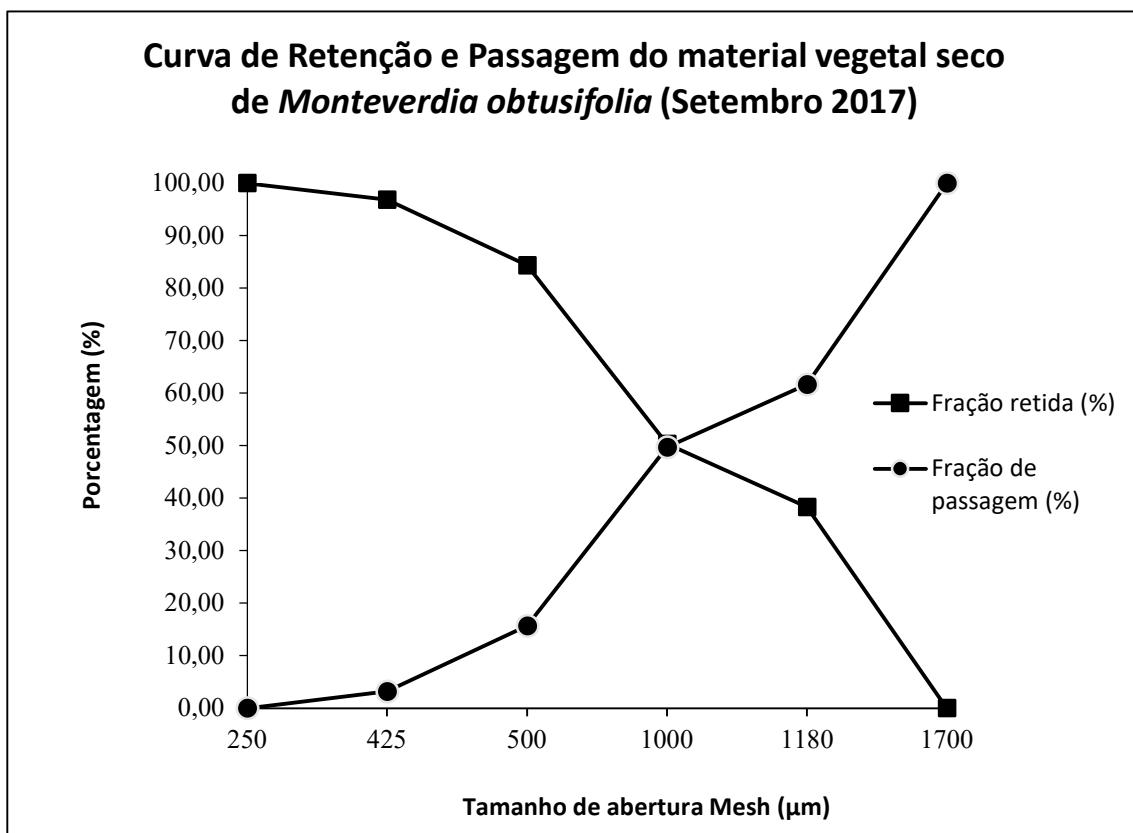
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 22. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Setembro 2017).



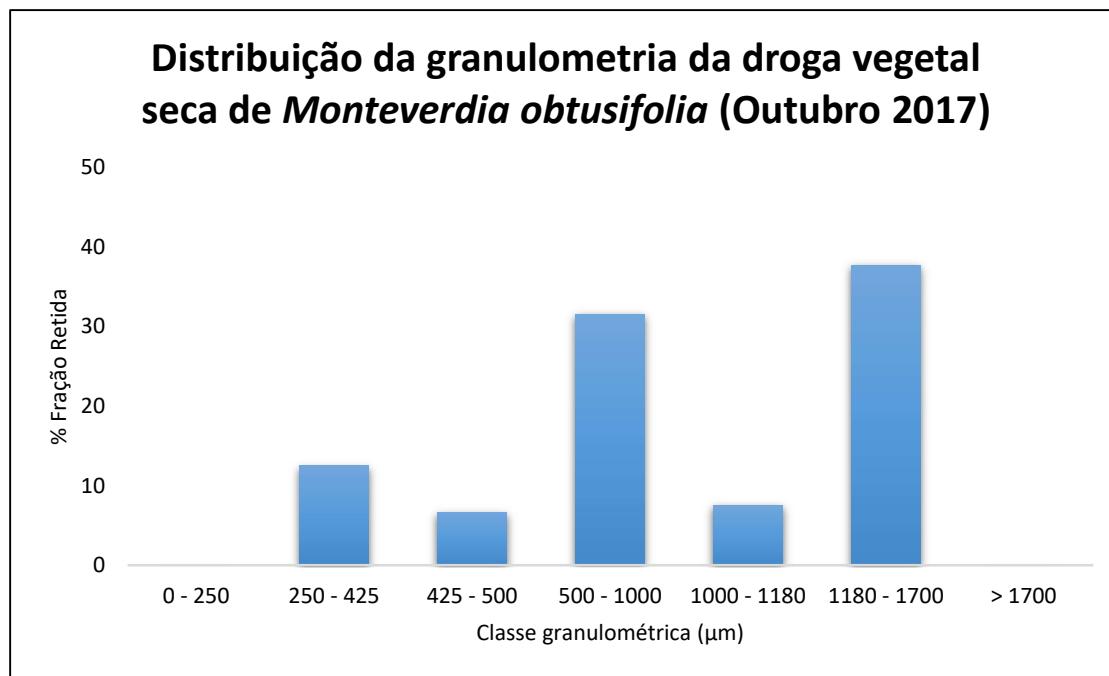
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 23. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Setembro).



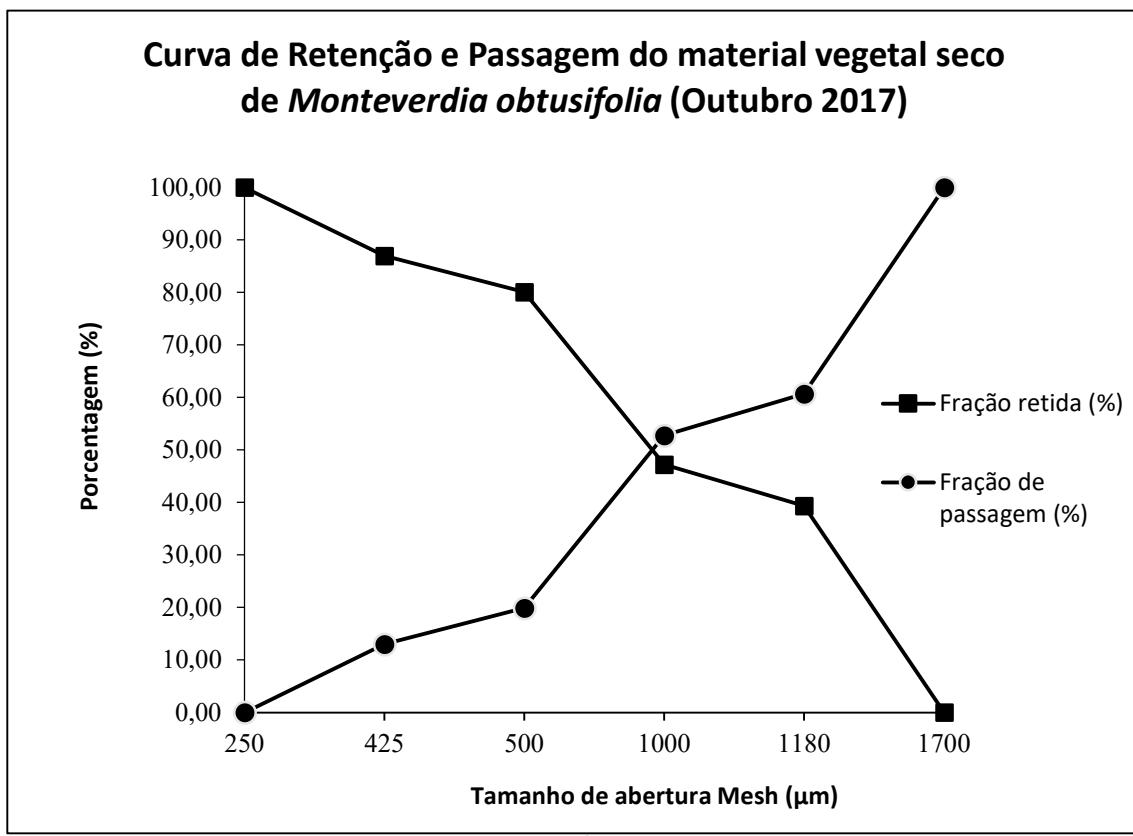
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 24. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Outubro 2017).



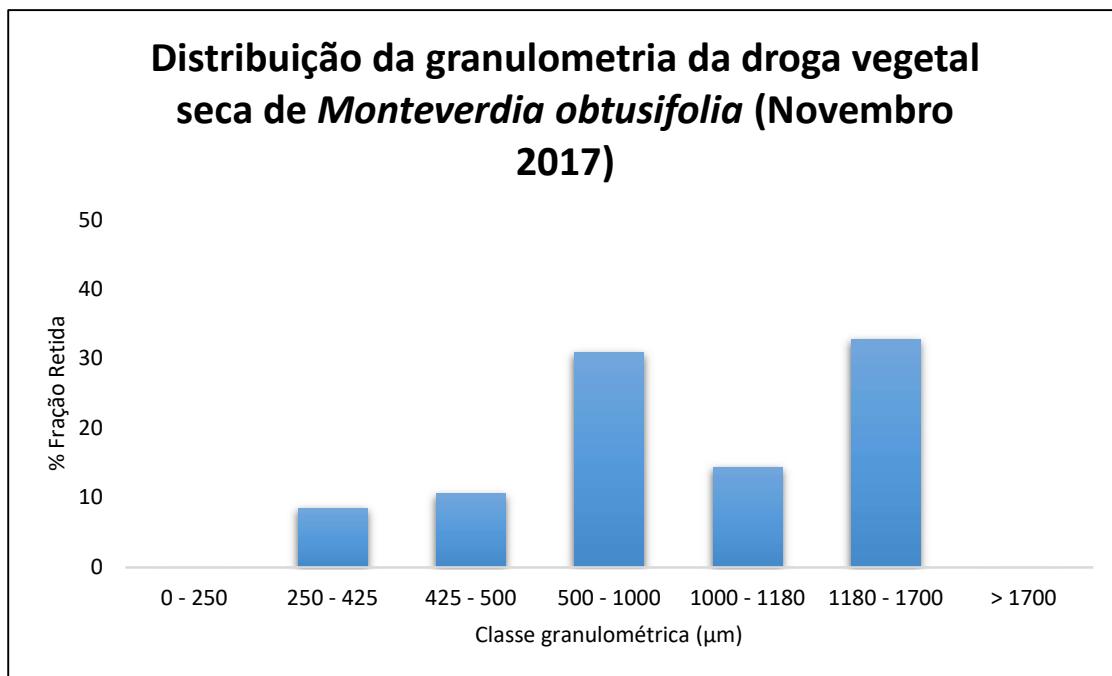
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 25. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Outubro).



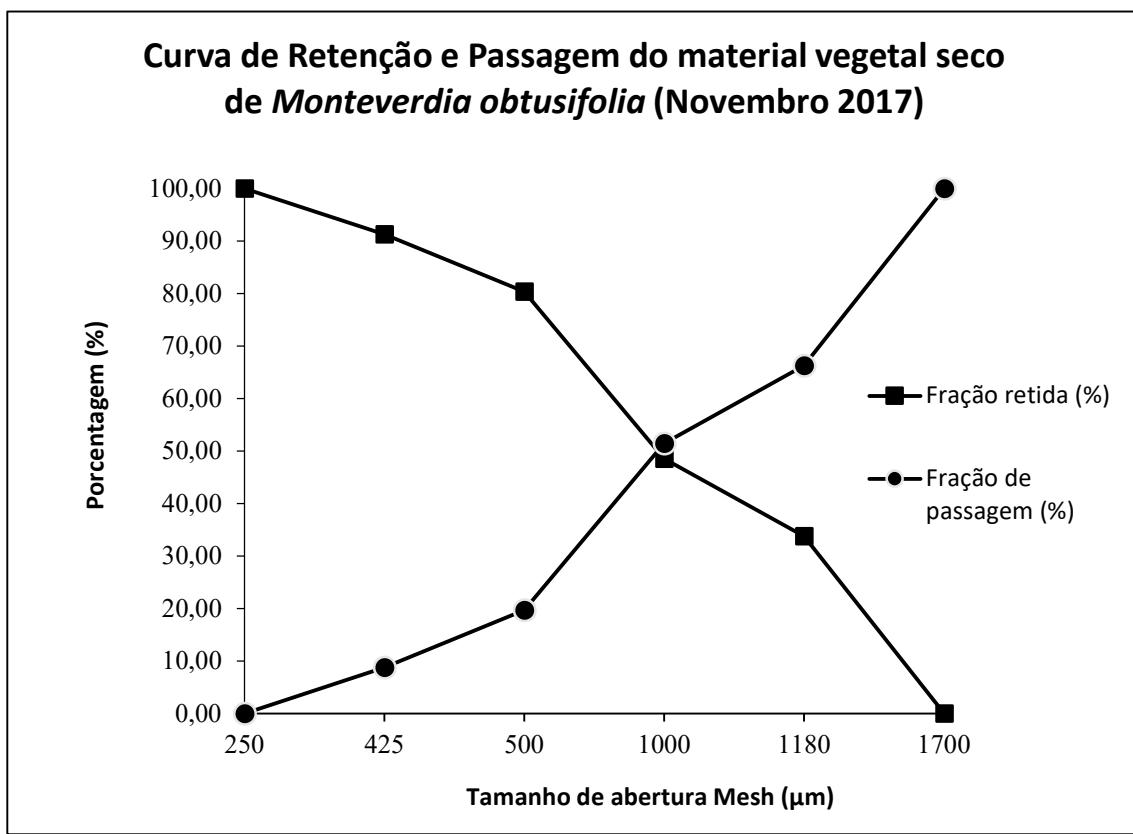
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 26. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Novembro 2017).



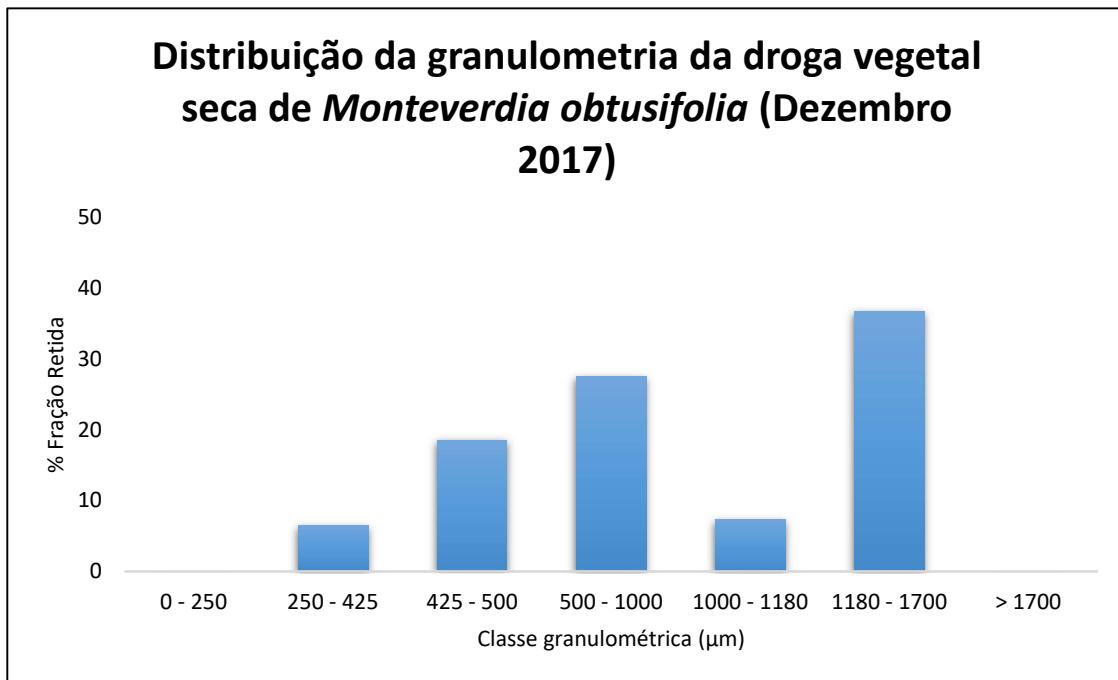
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 27. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Novembro).



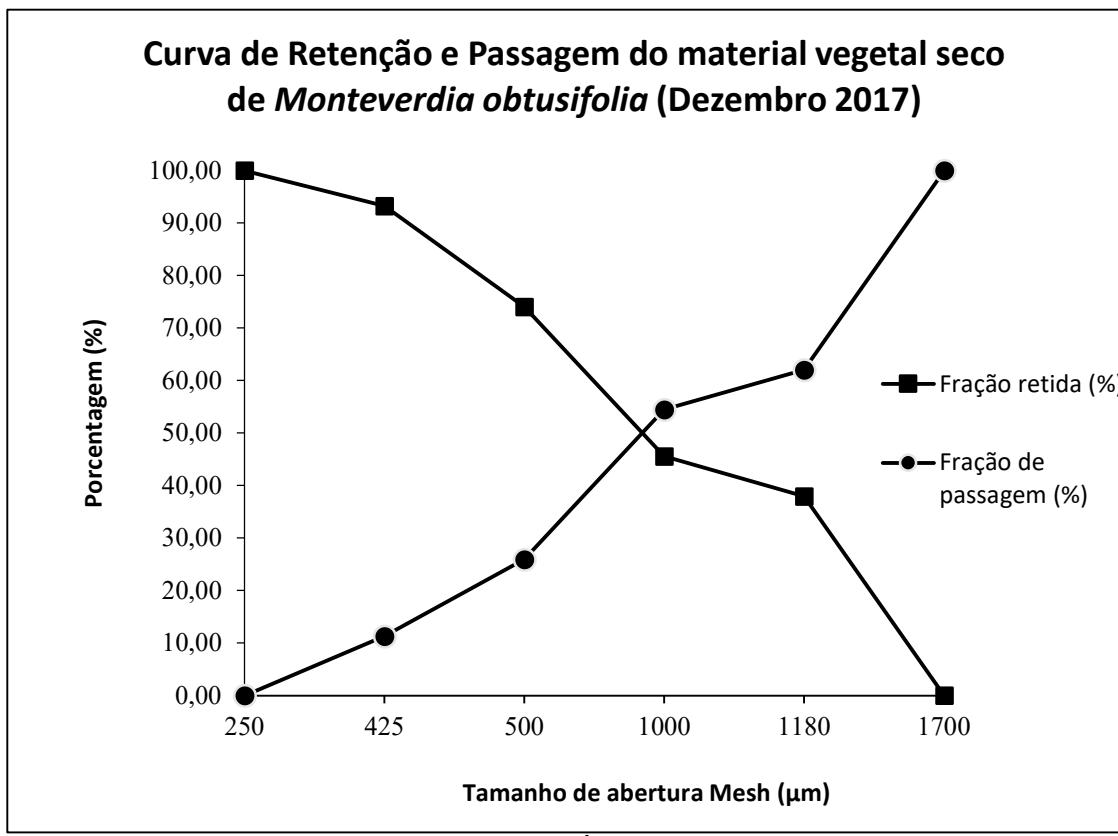
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 28. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Dezembro 2017).



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 29. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia obtusifolia* (Dezembro).



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados referentes às drogas vegetais de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral estão dispostos nos Gráficos 30 a 37, referentes aos pós obtidos no mês de junho 2018.

Gráfico 30. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).

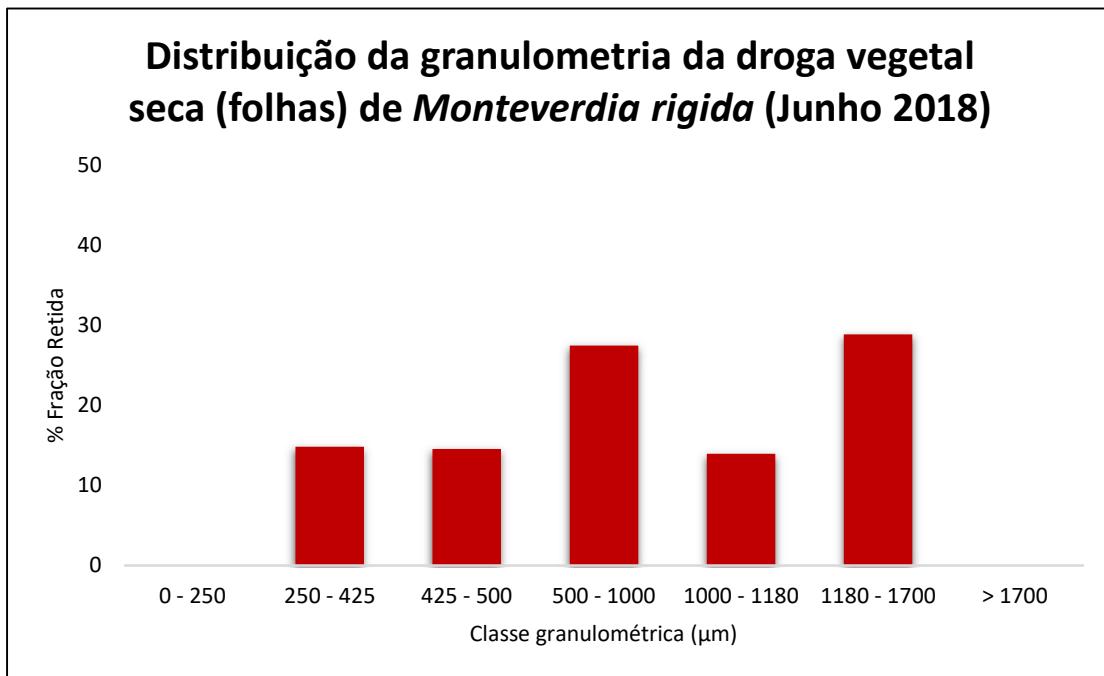
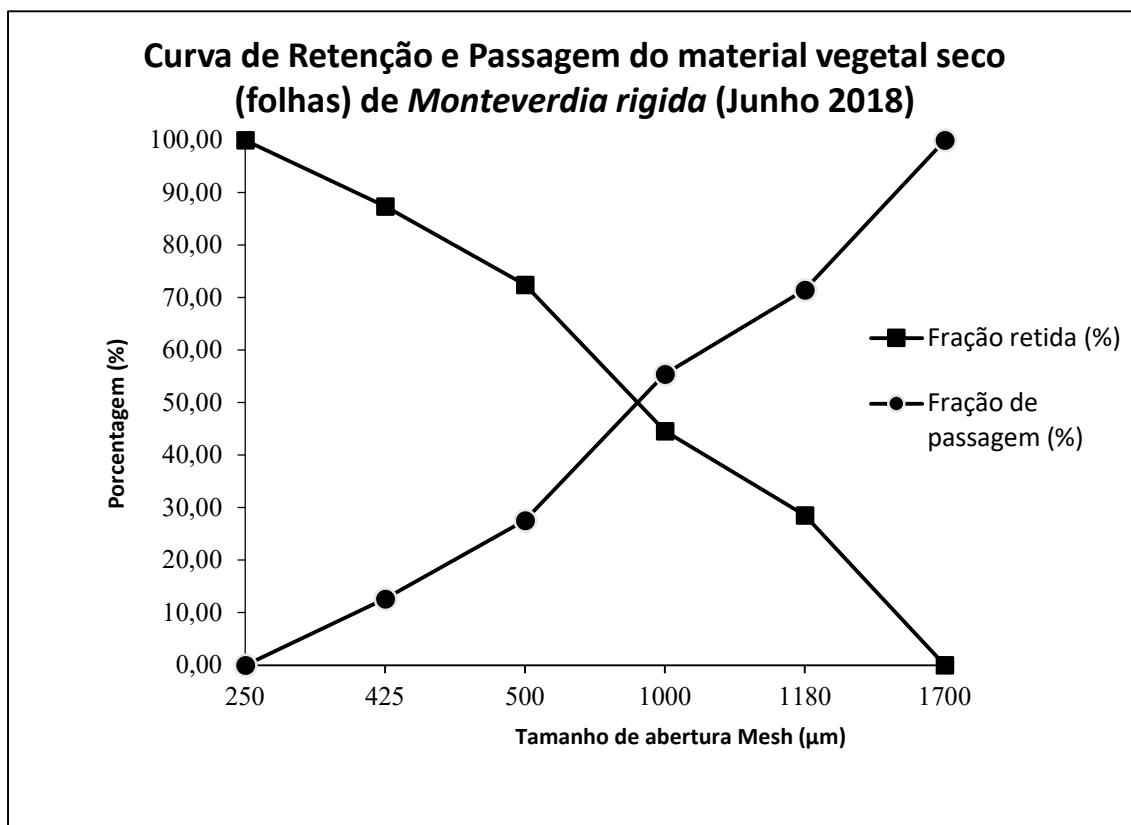
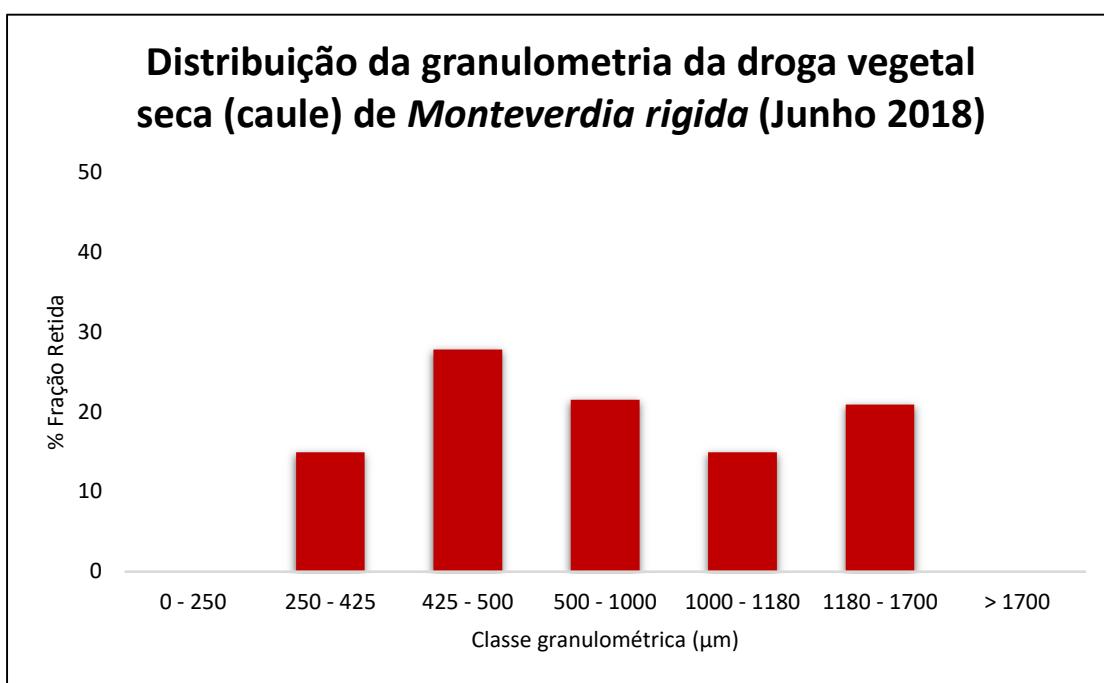


Gráfico 31. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco das folhas de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



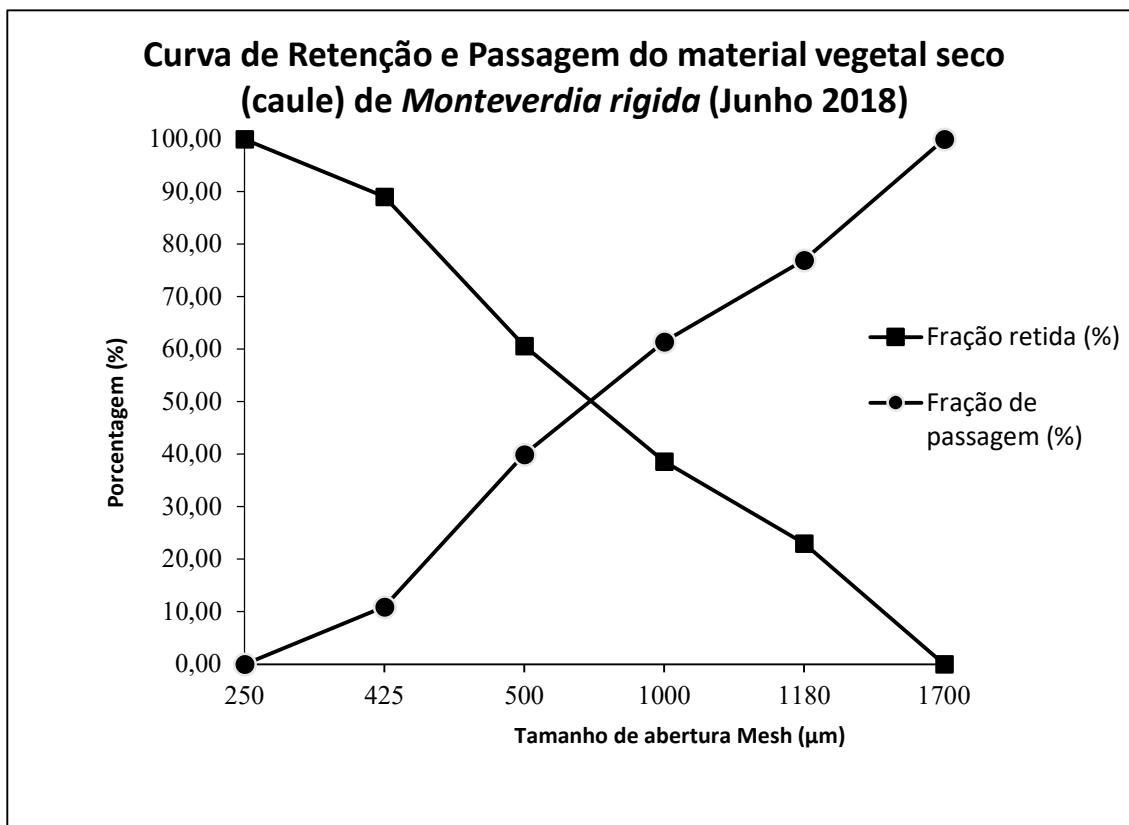
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 32. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco do caule de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



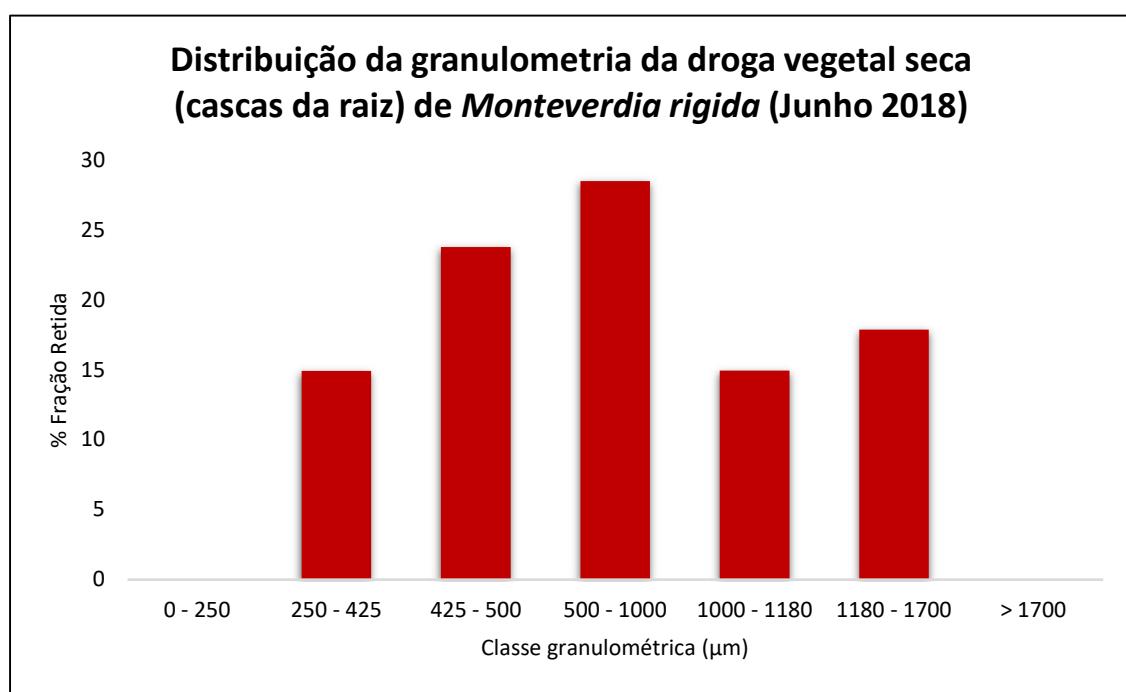
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 33. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco do caule folhas de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



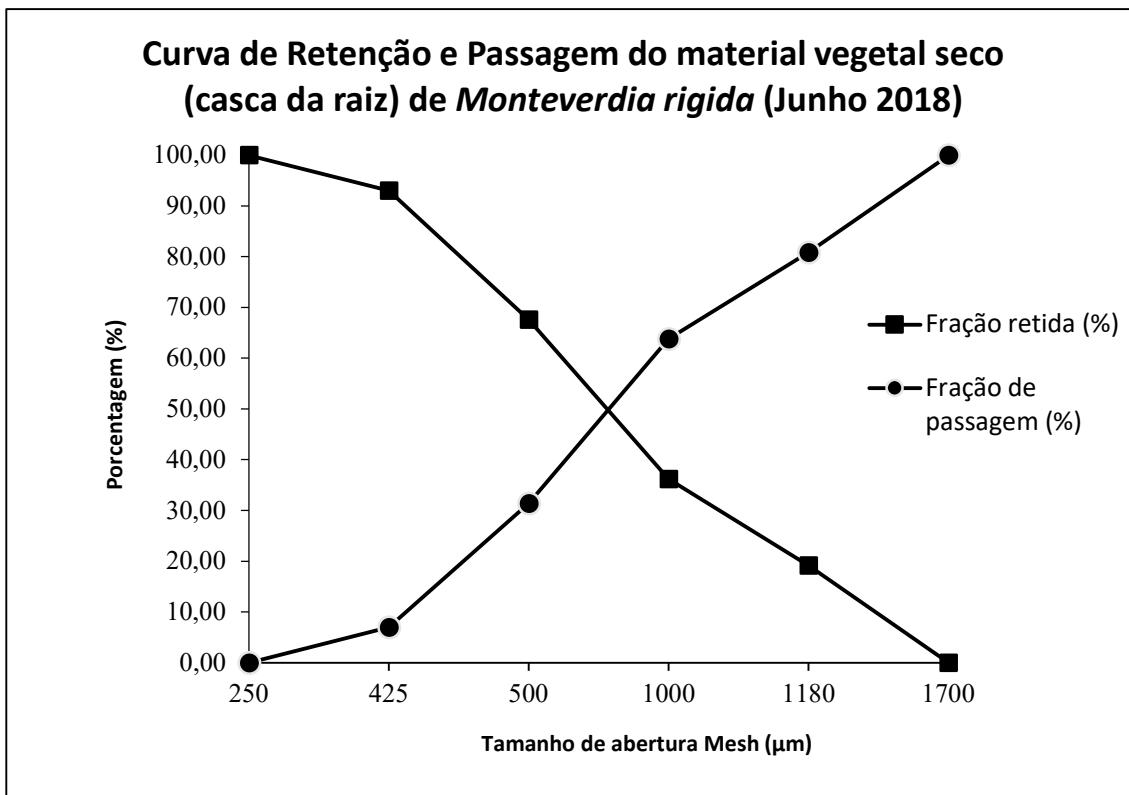
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 34. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco da casca da raiz de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



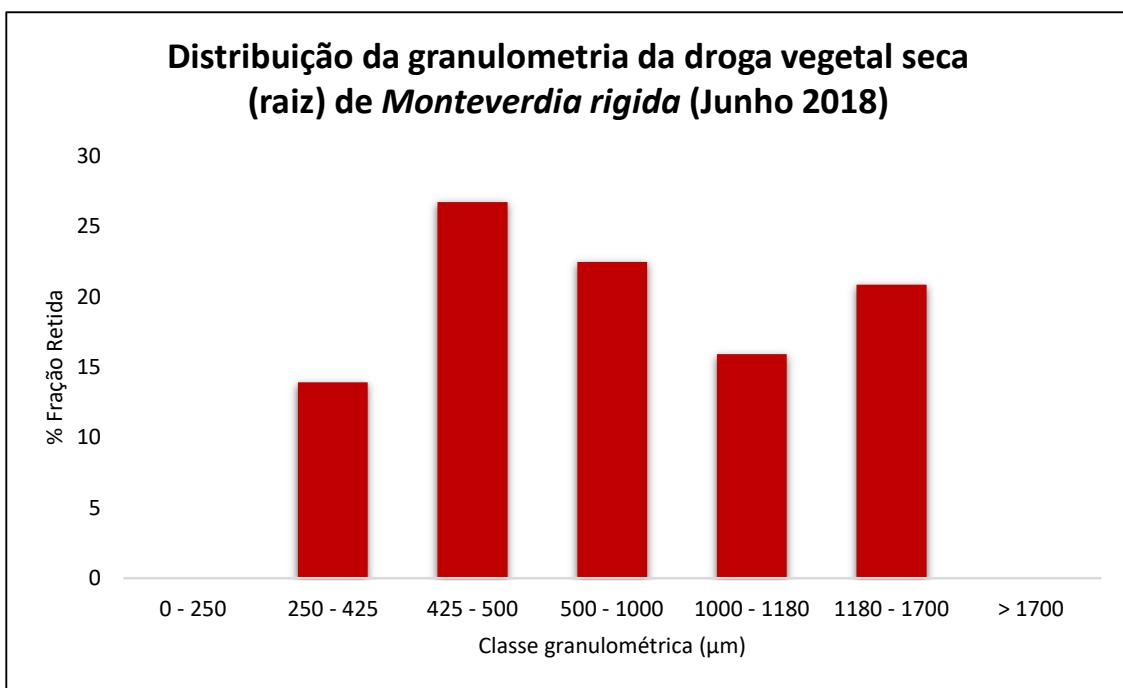
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 35. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco da casca da raiz de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



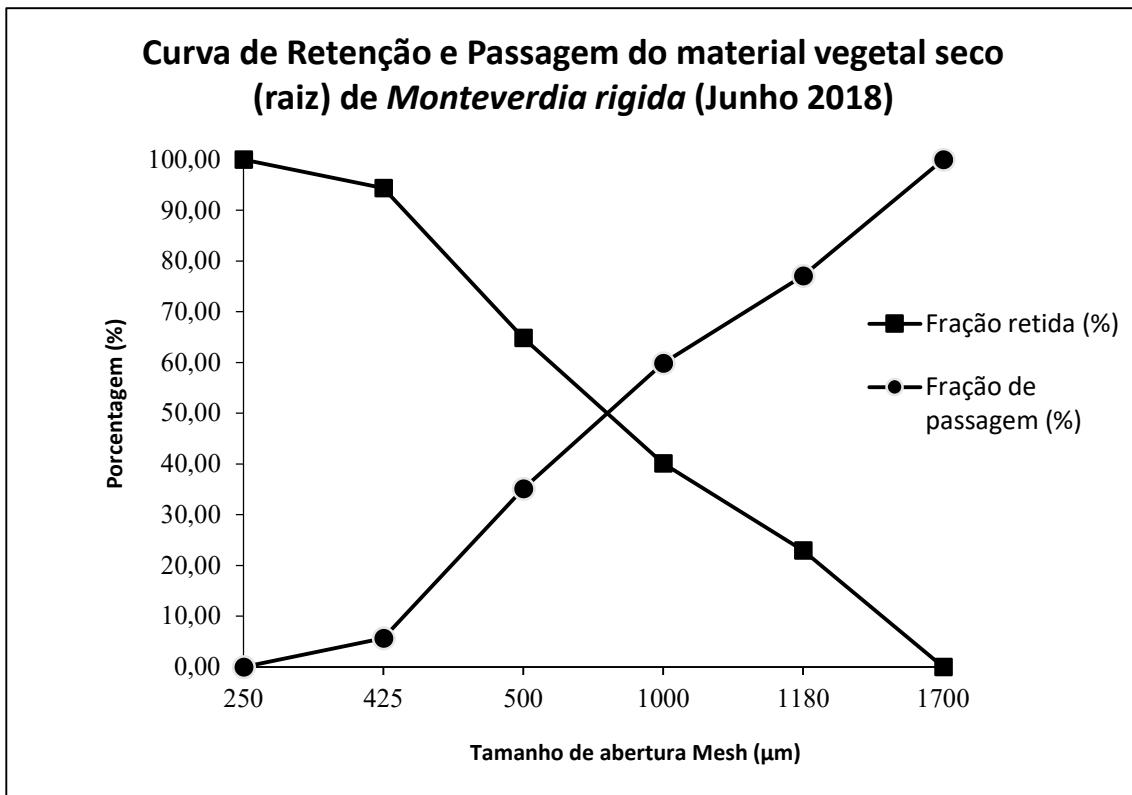
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 36. Histograma de distribuição da granulometria do material vegetal seco da raiz de *Monteverdia rigida* (Junho 2018).



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 37. Curva de retenção e passagem do material vegetal seco da raiz de *Monteverdia rigidida* (Junho 2018).



Os tamanhos médios de partícula obtidos para as duas espécies foram compilados na Tabela 25.

Tabela 25. Tamanho médio de partículas obtidos através da metodologia para “Determinação da granulometria de pós”, nas drogas vegetais secas de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletadas nos meses de janeiro a dezembro de 2017 e *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.

Espécie	Material analisado	Ensaio limite de metais pesados	Resultados
<i>Monteverdia obtusifolia</i>	Folhas	Janeiro/17	883 µm
		Fevereiro/17	888 µm
		Março/17	878 µm
		Abril/17	852 µm
		Maio/17	870 µm
		Junho/17	852 µm
		Julho/17	936 µm
		Agosto/17	944 µm
		Setembro/17	975 µm
		Outubro/17	930 µm
		Novembro/17	975 µm
		Dezembro/17	896 µm
Média anual		906,6 µm	
<i>Monteverdia rigida</i>	Folhas		850 µm
	Caule	Junho/18	737 µm
	Cascas da raiz		765 µm
	Raiz		796 µm

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Ao analisar os dados obtidos, foi possível observar que a granulometria média anual do material das folhas de *M. obtusifolia* foi de 906 µm, variando entre 852 µm (mínimo) e 975 µm (máximo). De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6^a ed. (BRASIL, 2019a), os pós das drogas vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* podem ser caracterizados como pós grossos (1,7 mm/ 355 µm) visto que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 µm.

Pós grossos ou moderadamente grossos são considerados apropriados, pois partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e bloqueando a penetração do solvente ou, ainda, promover a passagem das partículas para o extrato conferindo um aspecto turvo no caso da maceração (MARQUES *et al.*, 2012).

Os pós das drogas vegetais do caule, casca da raiz e raiz de *M. rigida*, apresentaram valores inferiores aos observados nos resultados obtidos das folhas da espécie. Este comportamento pode ser atribuído aos fatores operacionais ligados ao tipo de moinho e às características originais da amostra. Como os caules e raízes secas da *M. rigida* apresentam-se mais grossos e rígidos, enquanto as folhas, mais finas e macias, é provável que a eficiência quanto ao grau de redução do tamanho de partícula no processo de moagem seja mediada por mecanismos diferentes, podendo a energia da moagem ser dissipada em deformações elástica e plástica, que não a de fratura (BARNI *et al.*, 2009). Este comportamento também foi observado em outras espécies vegetais como *Ipomoea pes-caprae*, *Leonotis nepetifolia*, *Lafoensia pacari* e *Hymenaea martiana* (BARNI *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2013; CARDOSO, 2013; OLIVEIRA, 2015).

É imprescindível que a droga vegetal esteja suficientemente pulverizada para que se consiga um bom rendimento no processo de extração dos constituintes químicos de interesse farmacêutico. A granulometria da matéria-prima vegetal é o parâmetro que determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado na obtenção de preparações intermediárias líquidas, como tintura ou extratos (ALVES *et al.*, 2010).

5.2.5 Determinação de cinzas

Os resultados obtidos através dos métodos farmacopeicos de “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas”, para a droga vegetal de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral estão expostos nas Tabelas 26 e 29 e plotados nos Gráficos 38 e 39.

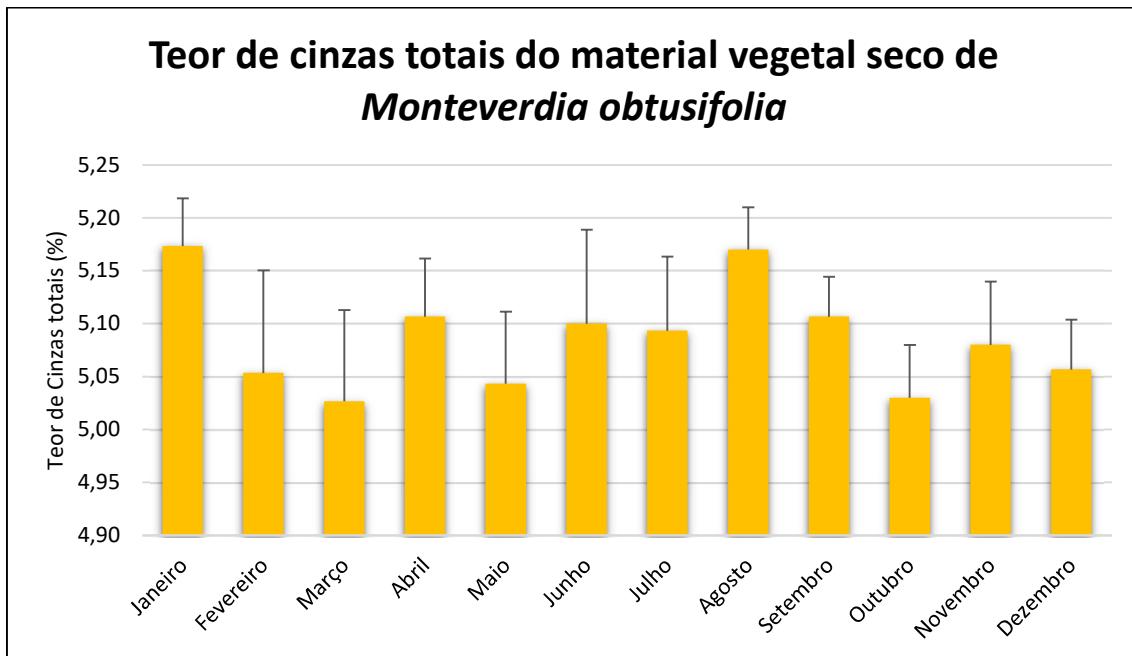
Tabela 26. Teores de cinzas totais obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas totais” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.

Cinzas totais	Resultados (n=3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
	5,22 %			
Janeiro/17	5,13 %	5,17 %	0,04	0,87
	5,17 %			
	5,03 %			
Fevereiro/17	4,97 %	5,05 %	0,09	1,92
	5,16 %			
	5,01 %			
Março/17	5,12 %	5,02 %	0,08	1,71
	4,95 %			
	5,16 %			
Abril/17	5,05 %	5,11 %	0,06	1,07
	5,11 %			
	5,02 %			
Maio/17	4,95 %	5,04 %	0,07	1,35
	4,99 %			
	5,17 %			
Junho/17	5,13 %	5,10 %	0,09	1,74
	5,00 %			
	5,16 %			
Julho/17	5,02 %	5,09 %	0,07	1,37
	5,10 %			
	5,17 %			
Agosto/17	5,13 %	5,17 %	0,04	0,77
	5,21 %			
	5,09 %			
Setembro/17	5,15 %	5,10 %	0,04	0,74
	5,08 %			
Outubro/17	4,98 %	5,03 %	0,05	0,99

	5,03 %			
	5,08 %			
	5,08 %			
Novembro/17	5,14 %	5,08 %	0,06	1,18
	5,02 %			
	5,11 %			
Dezembro/17	5,02 %	5,06 %	0,05	0,93
	5,04 %			
Média anual	5,09 %		0,06	1,22

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 38. Teores de cinzas totais obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas totais” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os valores de cinzas totais foram submetidos ao teste de ANOVA one way seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (1,69) foi inferior ao valor de F crítico (2,22), sugerindo que não existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P encontrado foi de 0,136 superior ao p<0,05, confirmando a similaridade entre as amostras, conforme observado na Tabela

27. O pós-teste de Tukey não apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 28).

Tabela 27. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas totais da droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia*.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,078666667	11	0,007151515	1,690443503	0,136440018	2,216308646
Dentro dos grupos	0,101533333	24	0,004230556			
Total	0,1802	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 28. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas totais.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,5272	0,2566	0,9775	0,4142	0,9565	0,9246	1	0,9775	0,2844	0,8244	0,5665	
FEV	3,196		1	0,9961	1	0,9988	0,9997	0,5665	0,9961	1	1	1
MAR	3,906	0,7101		0,9246	1	0,9565	0,9775	0,2844	0,9246	1	0,9961	1
ABR	1,775	1,42	2,13		0,9846	1	1	0,9846	1	0,942	1	0,9977
MAI	3,462	0,2663	0,4438	1,687		0,9935	0,9977	0,4507	0,9846	1	0,9999	1
JUN	1,953	1,243	1,953	0,1775	1,509		1	0,9683	1	0,9683	1	0,9994
JUL	2,13	1,065	1,775	0,3551	1,331	0,1775		0,942	1	0,9846	1	0,9999
AGO	0,08876	3,107	3,817	1,687	3,373	1,864	2,042		0,9846	0,3141	0,8539	0,606
SET	1,775	1,42	2,13	0	1,687	0,1775	0,3551	1,687		0,942	1	0,9977
OUT	3,817	0,6214	0,08876	2,042	0,3551	1,864	1,687	3,728	2,042		0,9977	1
NOV	2,485	0,7101	1,42	0,7101	0,9764	0,5326	0,3551	2,397	0,7101	1,331		1
DEZ	3,107	0,08876	0,7989	1,331	0,3551	1,154	0,9764	3,018	1,331	0,7101	0,6214	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

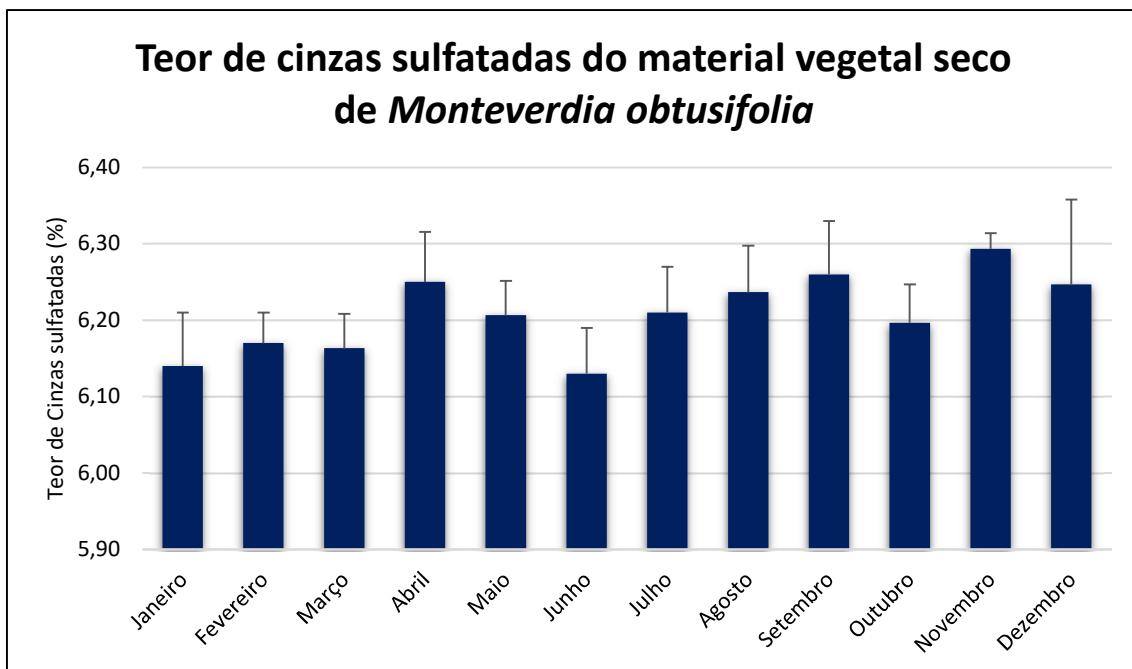
Tabela 29. Teores de cinzas sulfatadas obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.

Cinzas sulfatadas	Resultados (n=3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
	6,22 %			
Janeiro/17	6,11 %	6,14 %	0,07	1,14
	6,09 %			
Fevereiro/17	6,21 %	6,17 %	0,04	0,65

	6,13 %			
	6,17 %			
	6,16 %			
Março/17	6,21 %	6,16 %	0,05	0,73
	6,12 %			
	6,32 %			
Abril/17	6,24 %	6,25 %	0,07	1,05
	6,19 %			
	6,21 %			
Maio/17	6,16 %	6,21 %	0,05	0,73
	6,25 %			
	6,19 %			
Junho/17	6,07 %	6,13 %	0,06	0,98
	6,13 %			
	6,21 %			
Julho/17	6,15 %	6,21 %	0,06	0,97
	6,27 %			
	6,17 %			
Agosto/17	6,25 %	6,24 %	0,06	0,98
	6,29 %			
	6,18 %			
Setembro/17	6,29 %	6,26 %	0,07	1,12
	6,31 %			
	6,15 %			
Outubro/17	6,25 %	6,20 %	0,05	0,81
	6,19 %			
	6,30 %			
Novembro/17	6,31 %	6,29 %	0,02	0,33
	6,27 %			
	6,12 %			
Dezembro/17	6,29 %	6,25 %	0,11	1,79
	6,33 %			
Média anual	6,21 %		0,06	0,94

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 39. Teores de cinzas sulfatadas obtidas através da metodologia para “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), na droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral coletada nos meses de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (2,01) foi inferior ao valor de F_{critico} (2,22), sugerindo que não existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P encontrado foi de 0,074 superior ao p<0,05, confirmando a similaridade entre as amostras, conforme observado na Tabela 30. O pós-teste de Tukey não apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 31).

Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas sulfatadas da droga vegetal seca de *Monteverdia obtusifolia*.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,085030556	11	0,00773	2,012161	0,073751	2,216309
Dentro dos grupos	0,0922	24	0,003842			
Total	0,177230556	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 31. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas sulfatadas.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		1	1	0,5811	0,9684	1	0,956	0,7426	0,459	0,9905	0,1599	0,6226
FEV	0,8383		1	0,8999	0,9998	0,9995	0,9995	0,9684	0,814	1	0,4204	0,922
MAR	0,652	0,1863		0,8458	0,999	0,9999	0,9981	0,9406	0,7426	0,9999	0,3481	0,8745
ABR	3,074	2,236	2,422		0,999	0,459	0,9995	1	1	0,9941	0,999	1
MAI	1,863	1,025	1,211	1,211		0,922	1	1	0,9941	1	0,8458	0,9995
JUN	0,2794	1,118	0,9315	3,353	2,142		0,8999	0,6226	0,3481	0,9684	0,1094	0,4989
JUL	1,956	1,118	1,304	1,118	0,09315	2,236		1	0,9966	1	0,8745	0,9998
AGO	2,701	1,863	2,049	0,3726	0,8383	2,981	0,7452		1	0,9995	0,9905	1
SET	3,353	2,515	2,701	0,2794	1,49	3,633	1,397	0,652		0,978	0,9999	1
OUT	1,584	0,7452	0,9315	1,49	0,2794	1,863	0,3726	1,118	1,77		0,7426	0,9966
NOV	4,285	3,447	3,633	1,211	2,422	4,564	2,329	1,584	0,9315	2,701		0,9981
DEZ	2,981	2,142	2,329	0,09315	1,118	3,26	1,025	0,2794	0,3726	1,397	1,304	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 32. Teores de cinzas totais e cinzas sulfatadas obtidas através das metodologias farmacopeicas para “Determinação de cinzas totais” e “Determinação de cinzas sulfatadas” (n = 3), nas drogas vegetais secas *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.

Ensaio	Material analisado	Resultados (n = 3)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Cinzas totais	Folhas	5,12 %			
		5,19 %	5,17 %	0,05	0,91
		5,21 %			
	Caule	4,95 %			
		5,09 %	4,99 %	0,08	0,58
		4,93 %			
	Cascas da raiz	7,97 %			
		7,88 %	7,92 %	0,05	0,58
		7,91 %			
Cinzas sulfatadas	Raiz	5,51 %			
		5,39 %	5,44 %	0,06	1,15
		5,42 %			
	Folhas	6,51 %			
		6,44 %	6,50 %	0,05	0,93
		6,56 %			
	Caule	6,02 %			
		6,13 %	6,09 %	0,06	0,96
		6,11 %			
	Cascas da raiz	9,21 %			
		9,15 %	9,16 %	0,04	0,45
		9,13 %			
	Raiz	7,38 %			
		7,53 %	7,46 %	0,08	1,02
		7,48 %			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados encontrados para a metodologia de determinação de cinzas totais (mínimo 5,02% ± 0,08 e máximo 5,17% ± 0,04) das folhas de *M. obtusifolia*

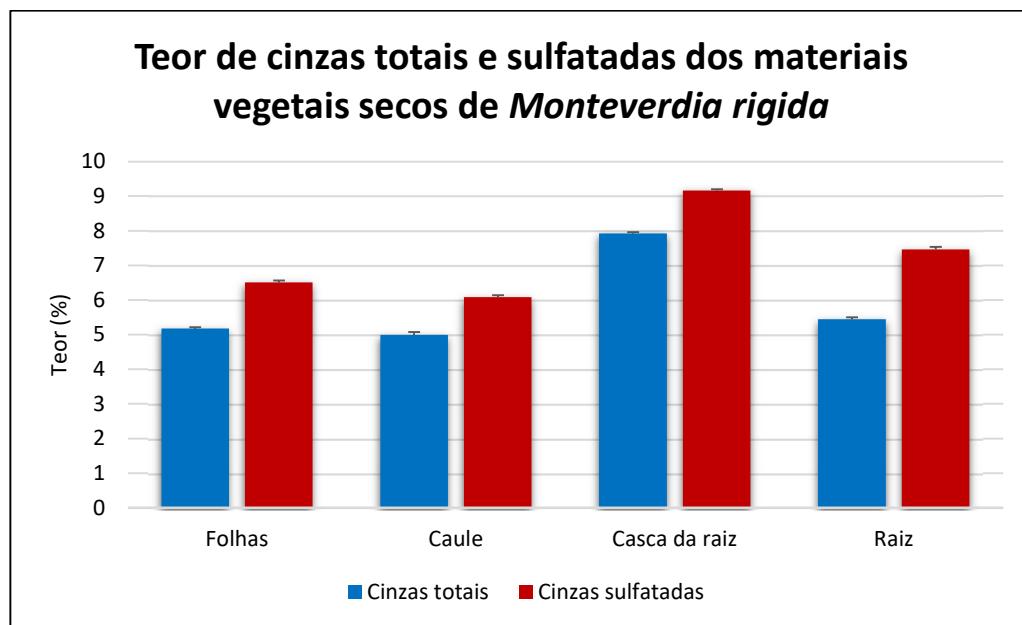
apresentaram valores condizentes ao limite preconizado para o tipo de material vegetal, visto que devido à inexistência de monografia oficial para a espécie, utilizou-se o valor base recomendado para a espécie *Monteverdia ilicifolia*, pertencente ao mesmo gênero do táxon em estudo, o valor máximo aceito pela Farmacopeia Brasileira 6^a edição em sua monografia é de até 8 % de cinzas totais. De modo semelhante, o teor de cinzas sulfatadas oriundos das folhas do material vegetal analisado (mínimo 6,13 % ± 0,06 e máximo 6,29% ± 0,02), foram inferiores ao limite estabelecido de até 12% (BRASIL, 2019b).

A metodologia proposta para a quantificação do teor de cinzas totais é referente à quantidade total de material orgânico residual remanescente após o processo de incineração, onde são inclusas as cinzas naturais (fisiológicas) derivadas do tecido vegetal e as cinzas não fisiológicas (inorgânicas) que podem ser provenientes de materiais estranhos como cascalho, areia ou terra que possam ficar aderidos à superfície do material vegetal analisado. São constituídas principalmente por carbonatos, fosfatos, silicatos e sílica pura (UPADHYAY *et al.*, 2019).

O método de determinação das cinzas sulfatadas se deve ao fato de que compostos voláteis (orgânicos e inorgânicos) são liberados quando o material analisado é incinerado, enquanto os compostos inorgânicos não voláteis permanecem nas cinzas (DE SOUZA *et al.*, 2020). Ao contrário da incineração, a volatilização de haletos de metais alcalinos (NaCl, KCl, etc.) é evitada pela adição de ácido sulfúrico concentrado, transformando essas substâncias em sulfetos alcalinos de baixa volatilidade e que apresentam maior estabilidade térmica (HINZ, 2007), resultando no maior teor para o material sulfatado.

As diferentes partes coletadas de *M. rigida* foram analisadas e forneceram os seguintes resultados (folhas - 5,17 % ± 0,05 para cinzas totais e 6,50 % ± 0,05 para cinzas sulfatadas), (caule - 4,99 % ± 0,08 para cinzas totais e 6,09 % ± 0,06 para cinzas sulfatadas), (casca da raiz – 7,92 % ± 0,05 para cinzas totais e 9,16 % ± 0,04 para cinzas sulfatadas) e (raiz - 5,44 % ± 0,06 para cinzas totais e 7,46 % ± 0,08 para cinzas sulfatadas) (Gráfico 40). De modo semelhante às folhas de *M. obtusifolia*, os teores obtidos para a segunda espécie, estão em acordo com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019b). Em estudo prévio, observou-se o valor de 5,10% de teor de cinzas totais para as folhas da espécie (ARAUJO *et al.*, 2018).

Gráfico 40. Teores de cinzas totais e sulfatadas obtidas das drogas vegetais secas de *Monteverdia rigida* (Mart) Biral.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Entretanto, ao analisar os valores obtidos para o caule, casca da raiz e cerne da raiz, percebe-se que não existem estudos de controle de qualidade com a espécie relatada e os manuscritos disponíveis para a padronização envolvem apenas as folhas da espécie *M. ilicifolia* (BORGES, 2005; CHIMIN et al., 2008; KLEIN; SPRENGER; PEREZ, 2009; YOKOTA et al., 2010; BAPTISTA; TAVEIRA, 2011; OLIVEIRA, 2016; POLSIN; KWASNIEWSKI; SCHAWARTZ, 2020).

Dessa forma, foi realizado um levantamento das monografias de espécies reconhecidas (caules e Raízes) para uso na Farmacopeia Brasileira 6^a ed e o intervalo de aceitação para teor de cinzas totais de Raízes foi de (4 % - 12 %) e para caules (2% - 10%) (BRASIL, 2019b). Também foram averiguados estudos de controle de qualidade de outras espécies da família Celastraceae, entretanto os manuscritos e valores encontrados foram insuficientes para determinação de um intervalo confiável (MOHAMAD et al., 2013; UPADHYE et al., 2019).

Portanto, os valores encontrados para os teores de cinzas totais e cinzas sulfatadas do caule, casca da raiz e cerne da raiz de *M. rigida*, podem servir para avaliações futuras envolvendo a espécie.

Os resultados de cinzas totais das diferentes partes de *M. rigida* foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (1426,52) foi superior ao valor de Fcrítico (4,06), sugerindo que existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P encontrado foi de $2,98 \times 10^{-11}$ inferior ao p0,05, confirmado a diferença entre as amostras, conforme observado na Tabela 33. O pós-teste de Tukey apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 34).

Assim como os testes anteriores, os resultados de cinzas sulfatadas também apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95% ($F 1532,25 > F_{crítico} 4,06$); (valor-P $2,24 \times 10^{-11} < 0,05$) (Tabela 35). O pós-teste de Tukey apresentou diferenças significativas entre os valores analisados (Tabela 36). Estas diferenças justificam-se pela diferente composição das diferentes partes avaliadas. De acordo com Ferreira *et al.*, (2001) as composições químicas de folhas, caules e raízes diferem no tocante à composição química e no teor de minerais, que se apresentam em maior quantidade nas folhas e raízes (TÁVORA; LIMA; HERNANDEZ, 2004; VELOSO, 2017).

Tabela 33. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas totais das diferentes partes da droga vegetal seca de *Monteverdia rigida*.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	16,94003	3	5,646675	1426,528	2,98E-11	4,066181
Dentro dos grupos	0,031667	8	0,003958			
Total	16,97169	11				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 34. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas totais das diferentes partes de *M. rigida*.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,03008	0,0002306	0,003806
Caule	5,047		0,0002306	0,0003
Casca Raiz	75,62	80,66		0,000231
Raiz	7,341	12,39	68,27	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 35. Análise de variância (ANOVA) da determinação de cinzas sulfatadas das diferentes partes da droga vegetal seca de *Monteverdia rigida*.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	16,816425	3	5,605475	1532,248	2,24045E-11	4,066180551
Dentro dos grupos	0,029266667	8	0,003658			
Total	16,84569167	11				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 36. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Determinação de cinzas sulfatadas das diferentes partes de *M. rigida*.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,000334	0,000231	0,000231
Caule	11,93		0,000231	0,000231
Casca Raiz	76,17	88,1		0,000231
Raiz	27,49	39,42	48,68	

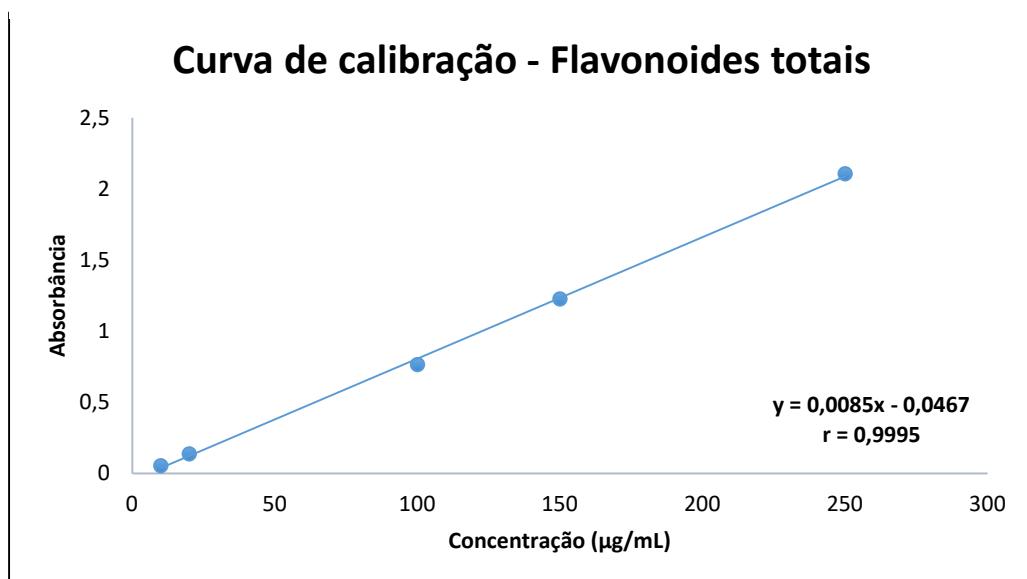
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os teores de cinzas totais e cinzas sulfatadas referentes às folhas dos materiais vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* para o mês de Junho, foram comparadas para verificação de equivalência por test t. Foi possível observar que $t_{calculado} (0,97) < t_{crítico} (4,3)$ para os teores de cinzas totais, demonstrando não haver diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. O valor-P ($0,433 > 0,05$) confirma a validade do teste executado. Para o teste de cinzas sulfatadas, $t_{calculado} (11,74) > t_{crítico} (4,3)$ demonstrando haver diferenças estatísticas significativas para as amostras analisadas. O valor-P ($0,007 < 0,05$) confirma a diferença entre as amostras.

5.2.6 Doseamento de flavonoides totais

A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos através da leitura das soluções do padrão Quercetina são apresentados no Gráfico 41. Os dados da validação da presente metodologia analítica estão detalhados no APÊNDICE A.

Gráfico 41. Curva de calibração (10 – 250 µg/mL) para doseamento de flavonoides totais expressos em equivalentes de Quercetina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados obtidos através do método para o doseamento de flavonoides totais desenvolvido por Schmidt & Ortega (1983) nos extratos etanólicos secos (EEB) e extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart. estão apresentados nas Tabelas 37 e 38 e foram dispostos nos gráficos 42 e 43, respectivamente. Os valores expressos em (µg EQ/mg de extrato) foram obtidos por cálculo matemático de acordo com a equação da reta ($y = 0,0085x - 0,0467$).

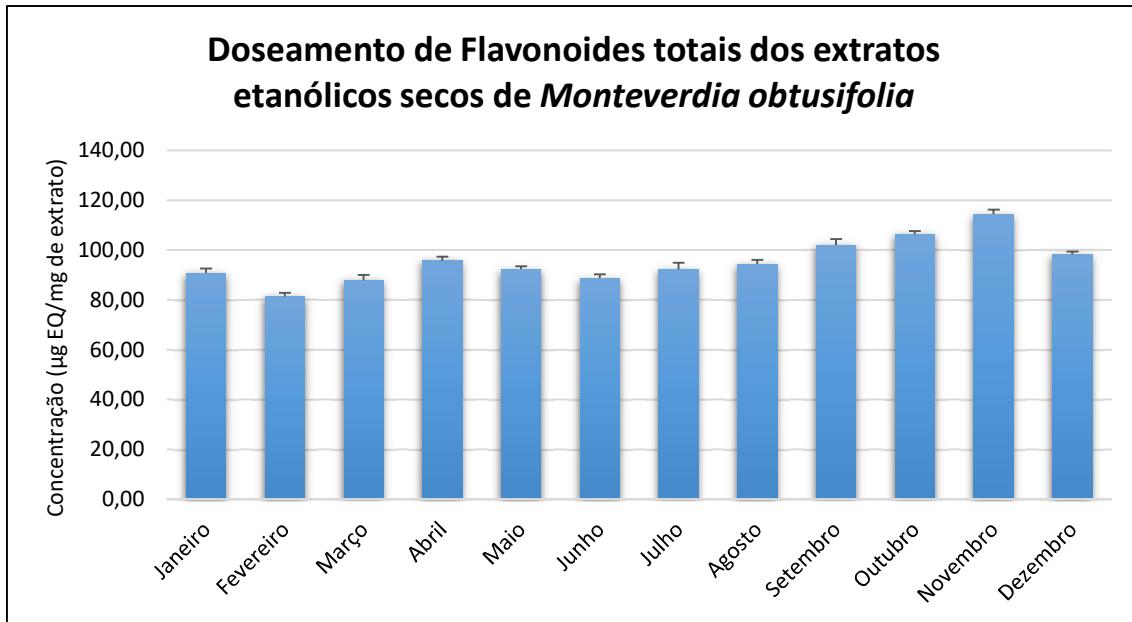
Tabela 37. Teores de flavonoides totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de flavonoides totais” ($n = 3$), nos extratos etanólicos de *Monteverdia obtusifolia* Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

Flavonóides totais (EEB)	Resultados ($n=3$) (µg EQ/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	91,49	90,90	1,79	1,96
	88,89			
Fevereiro	79,85	81,37	1,53	1,88
	81,35			
	82,91			

	90,32			
Março	86,24	87,91	2,14	2,43
	87,17			
	95,61			
Abril	97,40	95,77	1,56	1,63
	94,29			
	93,38			
Maio	91,12	92,39	1,15	1,25
	92,66			
	90,43			
Junho	87,55	88,80	1,48	1,66
	88,41			
	89,14			
Julho	93,22	92,24	2,75	2,98
	94,37			
	94,00			
Agosto	96,23	94,47	1,58	1,67
	93,18			
	100,08			
Setembro	101,20	102,03	2,48	2,43
	104,82			
	107,25			
Outubro	106,99	106,15	1,69	1,59
	104,21			
	114,36			
Novembro	116,27	114,42	1,82	1,59
	112,64			
	96,98			
Dezembro	99,35	98,27	1,20	1,22
	98,49			
Média anual	95,39		1,76	1,86

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 42. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólico secos, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

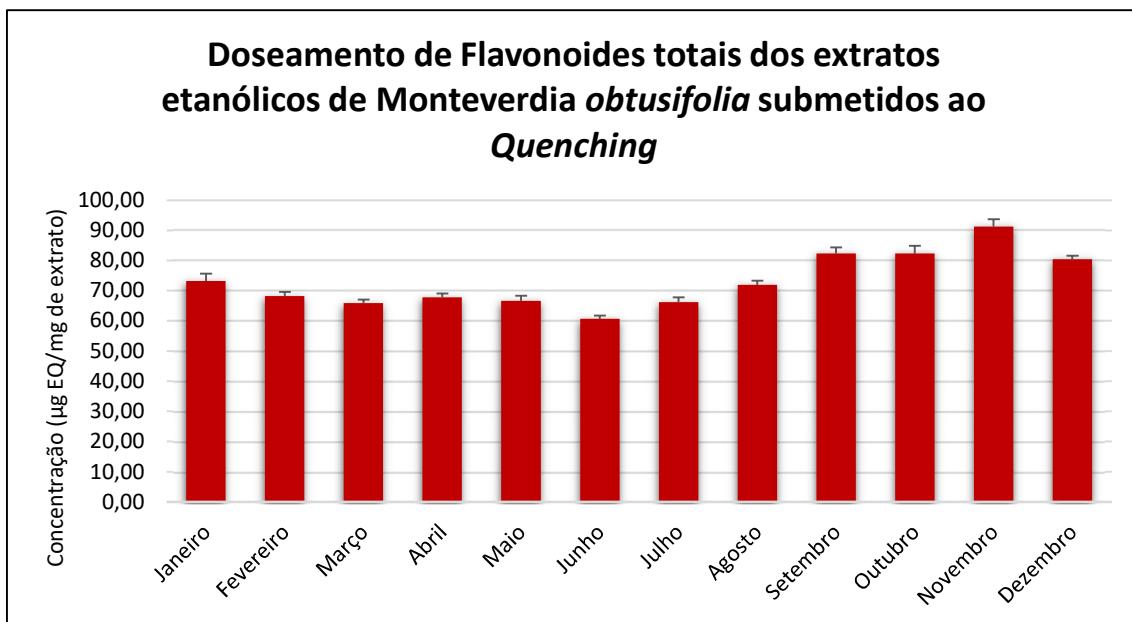
Tabela 38. Teores de flavonoides totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de flavonoides totais” (n = 3), nos extratos etanólicos submetidos ao Quenching de *Monteverdia obtusifolia* Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

Flavonóides totais (EEBq)	Resultados (n=3) (µg EQ/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	75,96	73,23	2,40	3,28
	72,31			
Fevereiro	71,43			
	68,90	68,18	1,49	2,19
Março	66,47			
	69,18			
Abril	67,25	65,88	1,23	1,86
	65,52			
	64,88			
	69,02	67,78	1,32	1,95
	66,39			

	67,93			
	68,61			
Maio	66,12	66,63	1,78	2,67
	65,17			
	59,32			
Junho	61,26	60,66	1,16	1,92
	61,40			
	65,67			
Julho	67,99	66,23	1,56	2,36
	65,02			
	73,14			
Agosto	70,25	71,90	1,49	2,07
	72,31			
	84,29			
Setembro	80,07	82,30	2,12	2,58
	82,55			
	85,24			
Outubro	80,17	82,29	2,64	3,20
	81,45			
	94,08			
Novembro	90,33	91,23	2,53	2,77
	89,27			
	80,68			
Dezembro	79,13	80,41	1,17	1,45
	81,42			
Média anual	73,06		1,74	2,36

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 43. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos submetidos ao *Quenching*, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os teores de flavonoides totais calculados como equivalentes de Quercetina encontrados nos extratos etanólicos brutos e nos extratos etanólicos submetidos ao *quenching* de *Monteverdia obtusifolia*, obtidos entre os meses de janeiro a dezembro de 2017, evidenciam a profusão do teor de flavonoides encontrados na espécie.

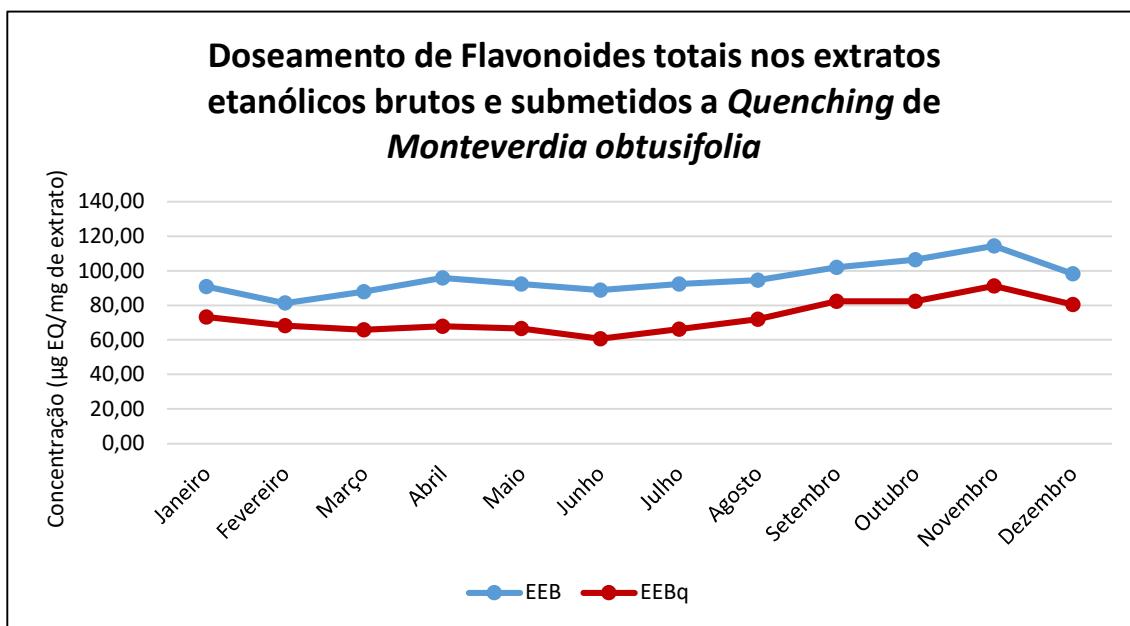
Os flavonoides constituem uma classe extensamente distribuída no reino vegetal e apresentam diversas funções biológicas e propriedades farmacológicas. Este grupo tem sido amplamente relatado no gênero *Monteverdia*, sendo o possível responsável por diversas indicações populares. Entre as quais destacam-se a atividade antiulcerogênica (MOTA *et al.*, 2009; TABACH *et al.*, 2017), antimicrobiana (MAGALHÃES *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ALAJMI & ALAM, 2014), antinociceptiva (MAINÁ *et al.*, 2015), entre outras.

A técnica espectrofotométrica de doseamento de flavonoides totais forneceu resultados variáveis ao longo do ano para os extratos etanólicos brutos (EEB) e extratos etanólicos submetidos ao *quenching* (EEBq). Foram observados valores máximos no conteúdo de flavonoides no mês de novembro de 2017 para o EEB (114,42 µg EQ/mg extrato \pm 1,82) e os menores valores foram registrados no mês de fevereiro de 2017 (81,37 µg EQ/mg extrato \pm 1,53). O valor máximo observado para o EEBq foi registrado no mês de novembro (91,23 µg EQ/mg extrato \pm 2,53), enquanto o menor valor encontrado

correspondeu ao extrato obtido no mês de junho (60,66 µg EQ/mg extrato \pm 1,16).

De modo geral, é possível observar uma tendência em ambos os tipos de extratos (EEB e EEBq). Inicialmente, ocorre um decréscimo dos teores de flavonoides ao longo do curso do verão (dezembro a fevereiro), seguido de um leve incremento nos teores durante os meses de outono (março a maio). Durante os meses de maior pluviometria (junho a agosto) é observada uma manutenção nos teores de flavonoides e, por fim, ocorre uma grande produção atingindo um ápice durante os meses da primavera (setembro a dezembro). Os dados comparativos estão dispostos no Gráfico 44.

Gráfico 44. Comparativo dos teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos e extratos submetidos ao *Quenching* de *Monteverdia obtusifolia*, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.
Fonte: ARAÚJO, 2021

Diversos fatores podem interferir, quantitativamente ou qualitativamente, na produção de metabólitos secundários, como os flavonoides. As diferenças na produção destes metabólitos entre estações climáticas podem estar relacionadas com defesa à herbivoria, visto que após períodos chuvosos aumentam o número de insetos herbívoros, enquanto que ao aproximar-se da

época de estiagem, ocorre um decréscimo significativo destes predadores (IANNUZZI *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2003). Outro fator é que grandes índices pluviométricos contínuos podem resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação (WATERMAN; MOLE, 1994; EVANS, 1996).

A produção de flavonoides parece não obedecer a um ritmo pré-estabelecido ou a condições específicas, mas a um conjunto de fatores como resposta biológica nas diferentes espécies. Em estudo realizado por Macedo *et al.* (2013) utilizando a espécie *Davilla rugosa*, foi possível observar maiores teores de flavonoides durante o verão e outono, indicando que a maior intensidade de radiação solar pode ser um dos fatores que favorece a maior produção desses compostos. Este fenômeno pode ser explicado, no caso de flavonoides, pela proteção proporcionada por estes metabólitos contra a foto-destruição ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Em estudo realizado com a espécie *Baccharis trimera*, foi possível verificar que os níveis de flavonoides das amostras coletadas no verão diferiram estatisticamente das demais, apresentando aumento considerável em relação às amostras coletadas no inverno, também foi possível observar que os menores índices foram registrados na primavera (BORELLA *et al.*, 2001). Entretanto, pesquisas realizadas por Cardoso *et al.* (2010), utilizando a espécie *Aloe arborescens*, constatam maiores teores de flavonoides durante os meses de outono e primavera, enquanto os meses de verão e inverno apresentaram os menores teores flavônicos.

De modo semelhante, Yariwake *et al.* (2005), utilizando as folhas da espécie *Monteverdia ilicifolia*, observaram o padrão de produção dos flavonoides apresentando os maiores teores durante a primavera, seguida do outono, inverno e verão. Este comportamento foi semelhante ao encontrado na espécie *Monteverdia obtusifolia* apoiando os resultados obtidos pela espécie em estudo.

As variações observadas entre os teores de flavonoides dos extratos EEB e EEBq podem ser explicadas pelo teor de água presente no material vegetal submetido ao *quenching* que corresponde a cerca de 40% do peso do material utilizado, visto que este processo não permite a retirada da umidade natural do material vegetal (as folhas são submetidas ao banho de nitrogênio líquido e

instantaneamente são pulverizadas e expostas ao líquido extrator).

Spagolla *et al.* (2009) observaram este comportamento particular da água no doseamento de flavonoides totais do mirtilo (*Vaccinium ashei*). De acordo com os autores, proporções superiores a 50% de água interferiram significativamente nos doseamentos dos flavonoides.

Com a finalidade de desenvolvimento de medicamento fitoterápico utilizando a espécie em estudo, recomenda-se realizar a colheita de *M. obtusifolia* no mês de novembro em que apresenta maior teor de flavonoides em sua composição, visto que esta classe de metabólitos secundários está diretamente relacionada à atividade antiulcerogênica (MOTA *et al.*, 2009; SERAFIM *et al.*, 2020).

Os dados dos extratos EEB e EEBq foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (74,45) para o EEBq foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), sugerindo que há diferença estatística entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. Confirmando esta teoria, o valor-P foi de $8,59 \times 10^{-16}$, menor que 0,05. O valor calculado de F (71,23) para o EEB também foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), assim como o valor-p ($1,45 \times 10^{-15}$) inferior a 0,05, rejeitando a hipótese nula em que as amostras são consideradas iguais, conforme observado nas Tabelas 39 e 41 (p. 89). As análises do pós-teste de Tukey confirmam que existem diferenças significativas entre as médias encontradas para os dois tipos de extratos, indicando que o teor de flavonoides totais sofre influência do fator sazonal apresentando resultados diferentes ao longo do ano (Tabela 40 e 42).

Tabela 39. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos submetidos ao Quenching (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEBq						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2702,75346	11	245,7049	74,45364	8,59E-16	2,216309
Dentro dos grupos	79,2025333	24	3,300106			
Total	2781,95599	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 40. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEBq.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,07651	0,002274	0,04294	0,007428	0,0001429	0,003889	0,9985	0,0002484	0,0002516	0,0001429	0,0001429	0,002976
FEV	4,815		0,915	1	0,9946	0,001741	0,9681	0,3819	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001431
MAR	7,008	2,193		0,9744	1	0,05991		1	0,0184	0,0001429	0,0001429	0,0001429
ABR	5,199	0,3846	1,808		0,9996	0,003252	0,9945	0,25	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAI	6,293	1,478	0,7151	1,093		0,01967		1	0,05631	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUN	11,99	7,173	4,98	6,789	5,695		0,03633	0,0001444	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	6,68	1,866	0,3274	1,481	0,3877	5,308		0,03099	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	1,271	3,544	5,737	3,928	5,021	10,72	5,409		0,0001513	0,0001516	0,0001429	0,0001429
SET	8,648	13,46	15,66	13,85	14,94	20,64	15,33	9,919		1	0,0002805	0,9747
OUT	8,632	13,45	15,64	13,83	14,92	20,62	15,31	9,903	0,01589		0,0002764	0,9762
NOV	17,16	21,97	24,16	22,36	23,45	29,14	23,84	18,43	8,508	8,524		0,0001466
DEZ	6,843	11,66	13,85	12,04	13,14	18,83	13,52	8,114	1,805	1,789	10,31	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 41. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEB

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2599,72627	11	236,3388	71,22988	1,43E-15	2,216309
Dentro dos grupos	79,6313333	24	3,317972			
Total	2679,3576	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 42. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEB.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,000191	0,6844	0,09974	0,9962	0,9497	0,9984	0,4405	0,0001449	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,00225
FEV	9,059		0,008387	0,000143	0,0001455	0,002081	0,0001464	0,000143	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAR	2,84	6,219		0,001079	0,166	1	0,1977	0,008129	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001525
ABR	4,631	13,69	7,471		0,5192	0,004248	0,4604	0,9989	0,0128300	0,0001522	0,0001429	0,858
MAI	1,417	10,48	4,257	3,214		0,4339		1	0,9523	0,0001810	0,0001429	0,0001429
JUN	1,997	7,062	0,8431	6,628	3,414		0,4916	0,03171	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001952
JUL	1,281	10,34	4,12	3,35	0,1363	3,277		0,9274	0,0001720	0,0001429	0,0001429	0,01849
AGO	3,398	12,46	6,238	1,233	1,981	5,295	2,117		0,00169	0,0001435	0,0001429	0,3543
SET	10,59	19,65	13,43	5,959	9,173	12,59	9,309	7,192		1	0,000143	0,3697
OUT	14,5	23,56	17,34	9,873	13,09	16,5	13,22	11,11	3,914		0,0006012	0,001048
NOV	22,37	31,43	25,21	17,74	20,95	24,37	21,09	18,97	11,78	8,524		0,0001429
DEZ	7,014	16,07	9,854	2,384	5,597	9,011	5,734	3,617	3,575	1,789	15,36	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os dados de flavonoides totais foram confrontados para avaliar se existem diferenças estatísticas significativas, em um intervalo de confiança de 95%, entre os tipos de tratamentos utilizados nos materiais vegetais. O teste ANOVA *one way* demonstrou haver diferença entre os extratos submetidos à secagem em estufa e ao *quenching* quando comparados no parâmetro teor de flavonoides totais ($F_{\text{calc}} 115,07 > F_{\text{crítico}} 3,98$; valor- $P 1,99 \times 10^{-16} < 0,05$). Em seguida, realizou-se o teste *t* de student que confirmou a diferença entre os tratamentos ($t_{\text{calc}} 10,72 > t_{\text{crít}} 1,994$; valor- $P 1,99 \times 10^{-16} < 0,05$).

Os teores de flavonoides totais obtidos a partir das drogas vegetais secas de *M. rigida* estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43. Teores de flavonoides totais obtidas através da metodologia validada para “Determinação de flavonoides totais” ($n = 3$), nas drogas vegetais secas *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletadas em junho de 2018.

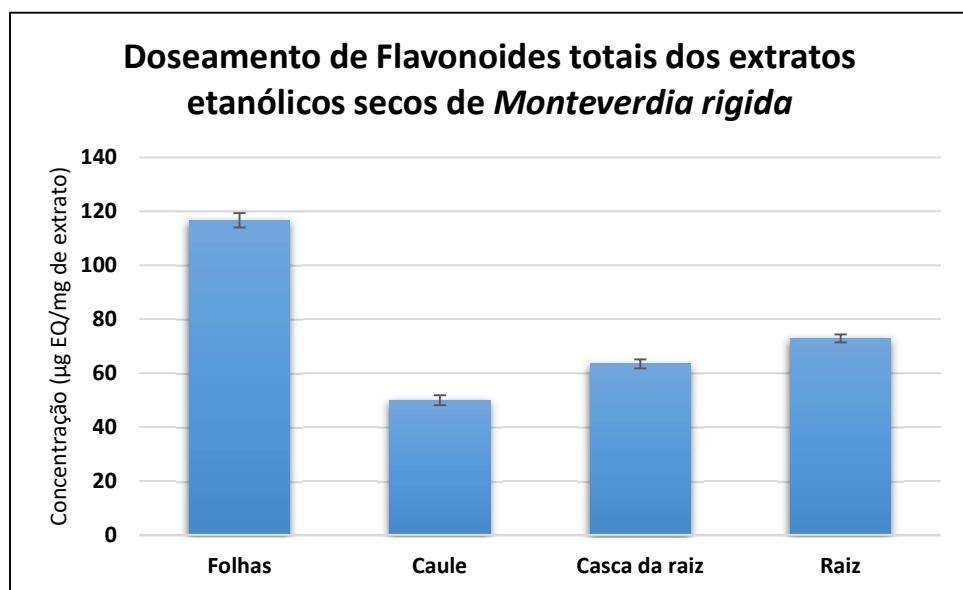
Ensaio	Material analisado	Resultados (n = 3) ($\mu\text{g EQ/mg de extrato}$)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Flavonoides totais		114,22			
	Folhas	116,37	116,7	2,66	2,28
		119,51			
		49,59			
	Caule	48,47	50,02	1,81	3,62
		52,01			
		62,11			
	Cascas da raiz	63,06	63,5	1,65	2,61
		65,33			
		73,35			
	Raiz	71,23	72,89	1,49	2,04
		74,10			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Ao avaliar o conteúdo flavonoídico da espécie *M. rigida*, foi possível observar diferentes teores de acordo com a origem do material vegetal. O maior índice foi detectado nas folhas ($116,7 \pm 2,66 \mu\text{g EQ/mg de extrato}$), seguido pelas raízes ($72,89 \pm 1,49 \mu\text{g EQ/mg de extrato}$), casca das raízes ($63,5 \pm 1,65 \mu\text{g}$

EQ/mg de extrato) e caule ($50,02 \pm 1,81$ µg EQ/mg de extrato) (Gráfico 45). A análise estatística por ANOVA *one way* seguido de pós-teste de Tukey, confirmou haver diferença estatística significativa entre todas as amostras analisadas para um nível de confiança de 95% (F 652,62 > F crítico 4,06; valor- P $6,74 \times 10^{-10} < 0,05$) (Tabela 44 e 45). O teste *t* foi realizado para comparação dos valores obtidos para os materiais vegetais das folhas de *M. obtusifolia* e *M. rigida* e confirmou a diferença estatística entre os resultados obtidos das diferentes espécies (t calculado $-12,92 < t$ crítico 4,3; valor- P $0,006 < 0,05$) (Tabela 44).

Gráfico 45. Teores de Flavonoides totais obtidos através da metodologia “Determinação de Flavonoides totais” ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos das diferentes partes de *M. rigida*.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 44. Análise de variância (ANOVA) do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos secos de *Monteverdia rigida*.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor- <i>P</i>	<i>F</i> crítico
Entre grupos	7490,951	3	2496,984	652,6199	6,74E-10	4,066180551
Dentro dos grupos	30,60873	8	3,826092			
Total	7521,559	11				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 45. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides totais dos extratos etanólicos secos de *Monteverdia rigida*.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,000231	0,000231	0,000231
Caule	59,04		0,000334	0,000231
Casca Raiz	47,11	11,93		0,00181
Raiz	38,79	20,25	8,318	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os maiores teores de flavonoides presentes nas folhas da espécie reforçam a importância da classe de metabólitos para a proteção à exposição solar. Os flavonoides são potentes sequestrantes de espécies reativas de oxigênio que evitam a peroxidação lipídica e eliminam os radicais livres, especialmente aqueles que possuem um grupo catecol no anel B do esqueleto dos flavonoides como os derivados de Quercetina (BRUNETTI *et al.*, 2018; AGATI *et al.*, 2020). Além disso, a exposição ao excesso de luz ou radiação UV-B aumentam a síntese de flavonoides antioxidantes eficazes do tipo di-hidroxi com anel B substituídos como os derivados luteolina às custas de outros flavonoides antioxidantes menos eficazes como o kaempferol (DEL VALLE *et al.*, 2020).

Os valores observados no caule, cascas e cerne da raiz refletem outro papel fundamental desempenhado pelos flavonoides no metabolismo vegetal, o de tolerância ao stress hídrico (TATTINI *et al.*, 2004), em que é possível observar o seu maior acúmulo em situações de menor disponibilidade de água para a espécie vegetal (NAKABAYASHI; MORI; SAITO, 2014; VARELA *et al.*, 2016). Este mecanismo de defesa ocorre devido à capacidade desses metabólitos em regular a homeostase de espécies reativas de oxigênio (LI *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Neri (2016), utilizando as folhas e o caule de *M. rigida* coletadas em junho de 2015, foi possível observar a presença de 138,68 µg EQ/mg de extrato nas folhas e 42,76 µg EQ/mg de extrato no caule da espécie. Estes resultados diferem dos teores encontrados no presente estudo, visto que fatores como diferentes índices pluviométricos, incidência de radiação e exposição à infecções ou herbivoria interferem no metabolismo dos flavonoides (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014). Weli *et al.* (2019) relataram a presença

de 12,75 µg EQ/mg de extrato no caule de *M. dhofarensis*, uma espécie utilizada no oriente médio.

De acordo com estudo realizado por Schwanz (2012) utilizando extratos aquosos das folhas de *M. cassineformes* e *M. dasyclada*, foi possível quantificar 3,7 µg EQ/mg de extrato e 3,19 µg EQ/mg de extrato, respectivamente para as espécies em estudo. Ahmed, McGaw e Ellouf (2013) observaram a presença de $77,45 \pm 1.43$ mg EQ/g planta utilizando extratos obtidos com uma mistura de 70% de acetona e hexano das folhas de *M. peduncularis*.

O método de quantificação de flavonoides totais utilizando a Quercetina como padrão externo tem boa aceitação entre os pesquisadores em todo o mundo, entretanto, existem variações no uso das metodologias empregando o marcador Rutina como padrão externo. Kpoyizoun (2020) realizou a quantificação de flavonoides totais das raízes de *M. senegalensis* utilizando extração hidroetanólica (50%) e observou a presença de 29,50 mg ER/g de extrato. Em estudo utilizando os extratos etanólicos das folhas das espécies *M. acanthophylla* e *M. truncata*, foi possível quantificar os teores de 26 e 28 µg ER/mL de extrato, respectivamente. No mesmo estudo foi avaliado o teor de flavonoides totais presentes na raiz de *M. rigida* (67 µg ER/mL de extrato) (PEREIRA *et al.*, 2020).

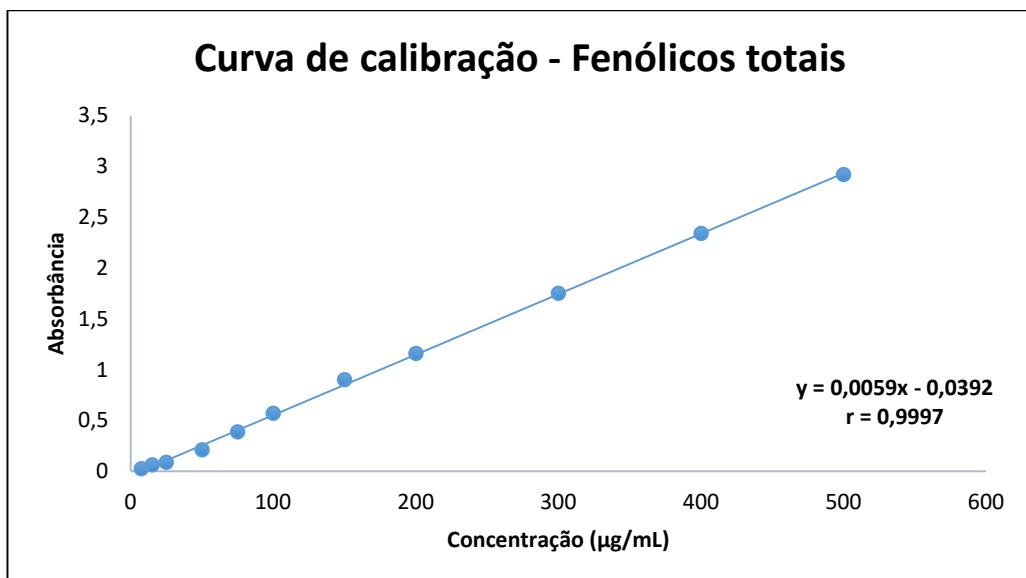
A ausência de monografias oficiais para determinadas espécies vegetais, utilizadas na cultura popular, favorecem as suas investigações científicas, entretanto são observados os usos das mais variadas técnicas para as quantificações, o que inviabiliza o processo de comparação entre os teores encontrados na literatura.

Os resultados de quantificação do teor de flavonoides totais encontrados para extratos obtidos das cascas e cerne das raízes desta espécie são relatados pela primeira vez na literatura e servem de suporte para ampliação do conhecimento da composição química de *M. rigida*, visto que não existem estudos de controle de qualidade suficientes dos materiais vegetais das espécies do gênero *Monteverdia*.

5.2.7 Doseamento de compostos fenólicos totais

A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos através da leitura das soluções do padrão ácido gálico são apresentados na Gráfico 46. Os dados da validação da presente metodologia analítica estão detalhados no APÊNDICE B.

Gráfico 46. Curva de calibração (7,5 – 500 $\mu\text{g/mL}$) para doseamento de fenólicos totais expressos em equivalentes de Ácido gálico.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados obtidos através do método de “Doseamento de compostos fenólicos totais” nos extratos etanólicos secos (EEB) e extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart. estão apresentados nas Tabelas 46 e 47 e foram dispostos nos gráficos 47 e 48, respectivamente. Os dados comparativos estão dispostos no Gráfico 49. Os valores expressos em ($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$) foram obtidos por cálculo matemático de acordo com a equação da reta ($y = 0,0059x - 0,0392$).

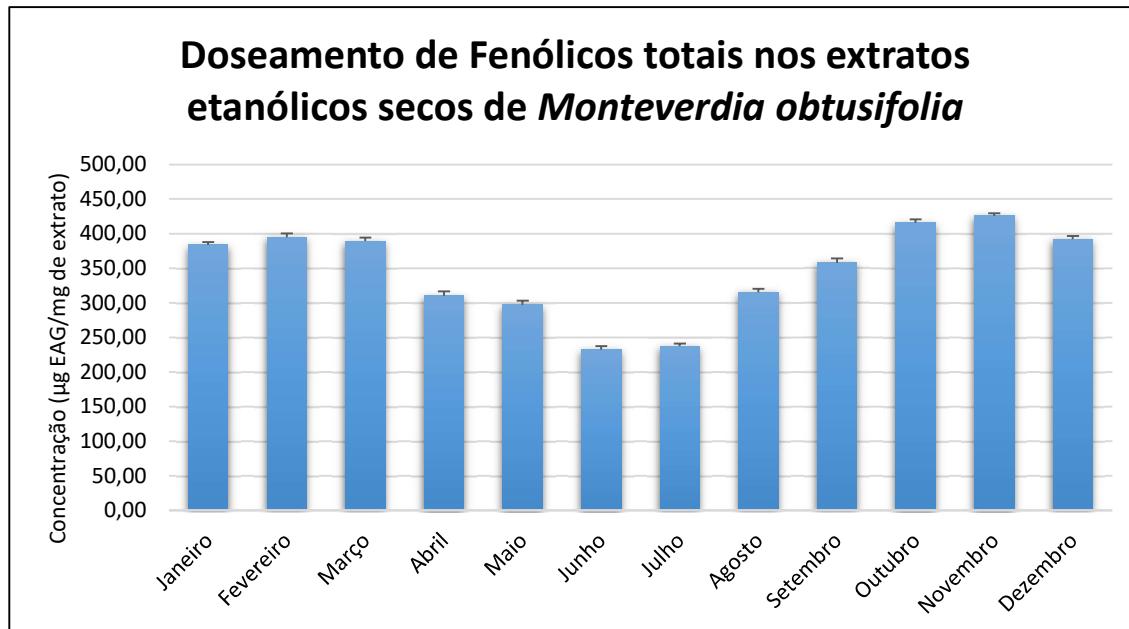
Tabela 46. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

Compostos fenólicos totais	Resultados (n=3) (μ g EAG/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	380,98			
	381,22	383,68	4,46	1,16
	388,83			
Fevereiro	396,59			
	389,13	394,99	5,24	1,33
	399,24			
Março	390,67			
	383,40	389,29	5,34	1,37
	393,81			
Abril	302,90			
	311,18	310,13	6,77	2,18
	316,32			
Maio	304,29			
	294,85	297,14	6,33	2,13
	292,27			
Junho	237,72			
	231,77	232,62	4,74	2,04
	228,36			
Julho	236,27			
	241,88	237,50	3,92	1,65
	234,34			
Agosto	320,60			
	314,57	315,45	4,77	1,51
	311,19			
Setembro	359,57			
	350,35	357,68	6,59	1,84
	363,12			

		416,31		
Outubro	420,62	415,67	5,30	1,28
	410,07			
	429,96			
Novembro	425,11	426,11	3,46	0,81
	423,25			
	396,83			
Dezembro	388,24	392,27	4,32	1,10
	391,73			
Média anual	346,04		5,10	1,53

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 47. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos Fenólicos Totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia*, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

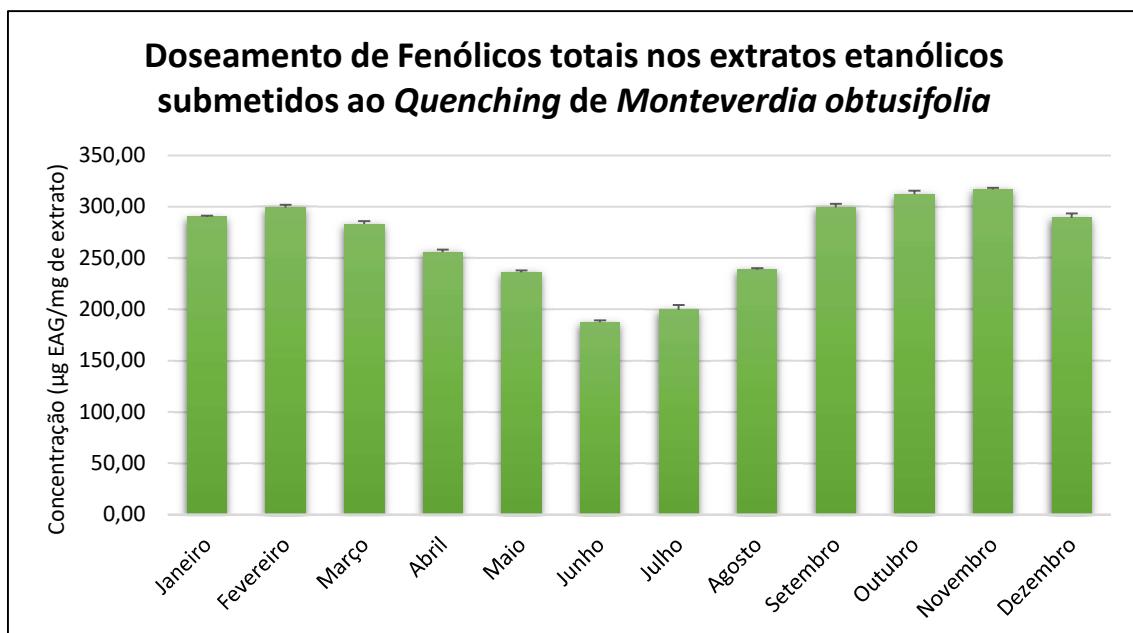
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 47. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia para “Doseamento de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos etanólicos (EEBq) submetidos ao *Quenching* de *Monteverdia obtusifolia* Mart obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

Compostos fenólicos totais	Resultados (n=3) (μ g EAG/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	288,60			
	291,12	290,06	1,31	0,45
	290,47			
Fevereiro	298,24			
	302,38	299,21	2,81	0,94
	297,01			
Março	286,40			
	282,53	283,23	2,88	1,02
	280,77			
Abril	258,65			
	255,13	255,97	2,37	0,93
	254,14			
Maio	238,26			
	236,05	236,34	1,80	0,76
	234,70			
Junho	185,31			
	189,25	187,52	2,01	1,07
	187,99			
Julho	204,78			
	198,43	199,81	4,44	2,22
	196,23			
Agosto	236,90			
	238,86	238,63	1,62	0,68
	240,12			
Setembro	303,17			
	299,46	299,63	3,46	1,16
	296,25			

		316,34		
Outubro	311,15	312,38	3,51	1,13
	309,64			
	318,54			
Novembro	316,78	316,88	1,61	0,51
	315,33			
	294,29			
Dezembro	285,98	289,22	4,45	1,54
	287,38			
Média anual	267,41		2,69	1,03

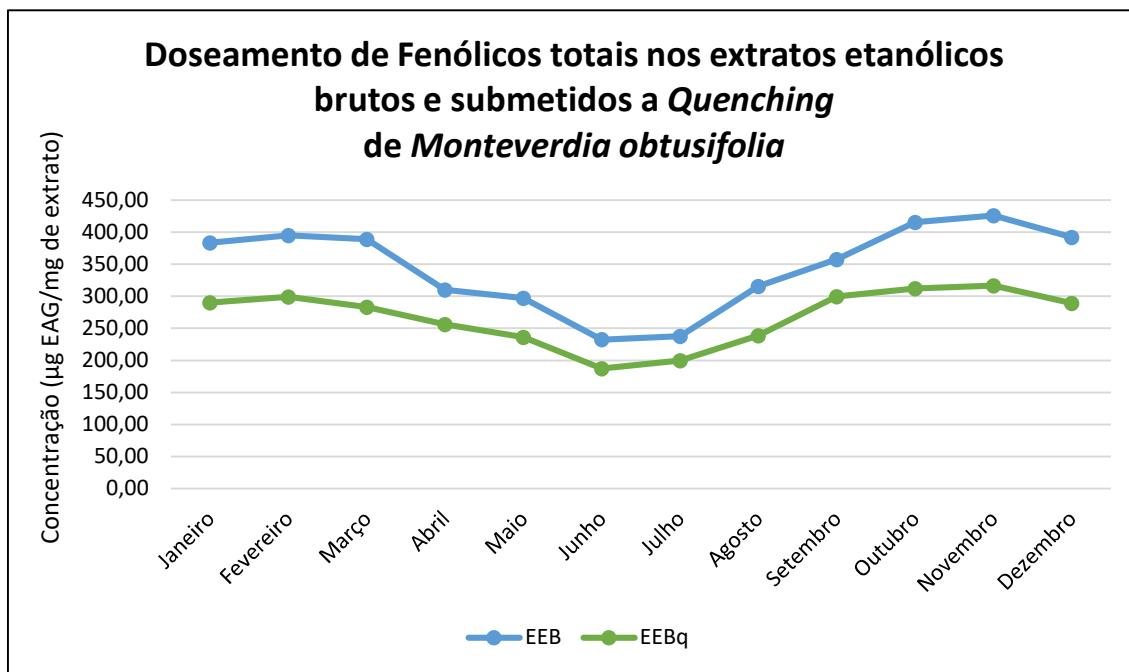
Gráfico 48. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos Fenólicos Totais” (n = 3) nos extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* de *Monteverdia obtusifolia*, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 49. Comparativo dos teores de compostos Fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de compostos Fenólicos totais” (n = 3) nos extratos etanólicos secos e extratos submetidos ao *Quenching* de *Monteverdia obtusifolia*, de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos etanólicos secos e nos extratos etanólicos submetidos ao *quenching* de *Monteverdia obtusifolia* Mart. evidenciam a abundância do conteúdo polifenólico encontrado na espécie em estudo, em comparação aos demais resultados publicados para o gênero. Estes resultados reforçam o potencial farmacológico da espécie, visto que estas classes de metabólitos estão relacionadas, principalmente, às atividades antimicrobiana, antiulcerogênica e antioxidante (GUPTA; SHARMA, 2012; SILVA *et al.*, 2009).

A análise dos dados revela que valores máximos no conteúdo de compostos fenólicos totais foram observados no mês de novembro de 2017 para o EEB (426,11 µg EAG/mg extrato ± 3,46), enquanto os menores teores foram obtidos no mês de junho de 2017 (232,62 µg EAG/mg extrato ± 4,74). Para o EEBq foi possível observar o teor máximo relacionado ao mês de novembro (316,88 µg EAG/mg extrato ± 1,61) e o menor teor encontrado correspondeu ao extrato obtido no mês de junho (187,52 µg EAG/mg extrato ± 2,01). Desse modo, é possível sugerir a colheita do material vegetal no mês de novembro para fins

de obtenção de produto fitoterápico. Uma vez que esta classe de compostos está relacionada às atividades gastroprotetoras e antiulcerogênicas preconizadas na medicina popular para esta espécie (SUMBUL *et al.*, 2011; FARZAEI; ABDOLLAHI; RAHIMI, 2015; JAIN, 2016; DEMARQUE *et al.*, 2018).

Assim como ocorre com a metodologia de doseamento de flavonoides totais, a ausência de método e monografia oficial para as espécies do gênero possibilitam a variação nas metodologias de quantificação de compostos fenólicos totais. O principal método utilizado pelos pesquisadores em todo o mundo é o desenvolvido por Singleton *et al.* (1999).

Em estudos realizados por Radomski (2006), avaliando diferentes formas de cultivo e exposição solar da espécie *M. ilicifolia*, foi possível observar a maior incidência de fenólicos totais nos extratos aquosos referentes aos grupos cultivados à pleno sol (19%), enquanto os grupos beneficiados à sombra, apresentaram os menores teores destes compostos (8%). Yariwake *et al.* (2005) realizaram a quantificação em extratos hidrometanólicos de *M. aquifolium* e observaram os maiores índices nos meses referentes à primavera (45,92 mg EAT/g material vegetal).

Utilizando metodologia semelhante à empregada no presente estudo e rutina como padrão externo, Haida *et al.* (2012) analisaram extratos aquosos e etanólicos das espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, onde verificaram maior teor de polifenóis no extrato aquoso da primeira espécie (283,13 µg ER/mL de extrato), enquanto o extrato etanólico de *M. aquifolium* mostrou-se rico em polifenóis (84,08 µg ER/mL de extrato). Comportamento semelhante ao observado por Pereira *et al.* (2020) que verificaram maiores índices de fenólicos nos extratos aquosos das folhas de *M. acanthophylla* (50 µg EAG/mL de extrato) e *M. truncata* (33 µg EAG/mL de extrato), frente aos extratos etanólicos 31 µg EAG/mL de extrato e 32 µg EAG/mL de extrato, respectivamente.

Ahmed *et al.* (2013) avaliaram o conteúdo fitoquímico de 4 espécies de *Maytenus* utilizadas na medicina popular do sul da África. Foram observadas variações entre 112 a 197 mg EAG/g material vegetal no teor de compostos fenólicos totais das espécies *M. peduncularis*, *M. procumbens*, *M. undata* e *M. senegalensis* que apresentou o maior teor entre os extratos analisados (197,44 mg EAG/g de material vegetal).

Cansian *et al.* (2015) constataram a presença de conteúdo fenólico em extratos aquosos de *M. dasyclada* (22 mg EAG/g extrato), *M. aquifolium* (24 mg EAG/g extrato) e *M. ilicifolia* (50 mg EAG/g extrato), observando teores mais elevados na última espécie. Este comportamento também foi verificado por Mariño *et al.* (2019) que comunicaram a presença de altos índices na espécie *M. ilicifolia* (119,33 µg EAG/mL extrato).

A investigação dos extratos acetato de etila de *M. cassineiformis* e *M. dasyclada*, demonstraram maior conteúdo de polifenóis totais (53,58 e 43,65 mg EAG/g extrato), respectivamente. Enquanto (22,76 e 14,59 mg EAG/g extrato) foram observados nos extratos etanólicos das espécies, indicando a possibilidade da maior capacidade de extração destes compostos pelo solvente acetato de etila (SCHWANZ, 2012). Resultados semelhantes foram relatados por Silva *et al.* (2009) que observaram maiores índices de fenólicos totais ao utilizarem acetato de etila como solvente extrator nas folhas de *M. imbricata* (659,27 mg EAG/g extrato).

Em relação à variação observada ao longo do ano, é possível verificar maiores índices de fenólicos nos meses em que apresentam maior fotoperíodo e maior incidência solar, havendo uma redução dos teores nos meses de junho e julho para ambos os extratos EEB e EEBq. De acordo com Radomski (2006), o teor de polifenóis varia de acordo com a luminosidade, sendo maior nas plantas que crescem a pleno sol em relação às plantas de sombra. Esta tendência é coerente com o papel fotoprotetor dos fenóis, inclusive os flavonoides, na defesa das plantas (HARBORNE, 1994).

Os dados dos extratos EEB e EEBq para fenólicos totais também foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (676,10) para o EEBq foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), sugerindo que há diferença estatística entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. Confirmado esta teoria, o valor-P foi de $4,13 \times 10^{-27}$, menor que 0,05. O valor calculado de F (488,81) para o EEB também foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), assim como o valor-p ($1,98 \times 10^{-25}$) inferior a 0,05, rejeitando a hipótese nula em que as amostras são consideradas iguais, conforme podem ser observados nas Tabelas 48 e 50 (p. 97). O pós-teste de Tukey confirma que existem diferenças significativas entre as médias encontradas para os dois tipos

de extratos, indicando que o teor de compostos fenólicos totais sofre influência do fator sazonal apresentando resultados diferentes ao longo do ano (Tabelas 49 e 51).

Tabela 48. Análise de variância (ANOVA) do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEBq

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	61904,7933	11	5627,70848	676,106146	4,1352E-27	2,216308646
Dentro dos grupos	199,768933	24	8,32370556			
Total	62104,5622	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 49. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Fenólicos Totais do EEBq.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		0,02723	0,2027	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0182600	0,0001429	0,0001429	1
FEV	5,491		0,000159	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	1	0,0005666	0,0001448	0,01201
MAR	4,1	9,592		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001528	0,0001429	0,0001429	0,3634
ABR	20,47	25,96	16,37		0,000143	0,0001429	0,0001429	0,0001459	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAI	31,25	37,75	28,15	11,79		0,0001429	0,0001429	0,997	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUN	61,56	67,05	57,46	41,1	29,31		0,001252	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	54,18	59,67	50,08	33,72	21,93	7,382		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	30,88	36,37	26,78	10,41	1,375	30,68	23,3		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	5,741	0,2501	9,842	26,21	38	67,3	59,92	36,62		0,0008185	0,0001462	0,007973
OUT	13,4	7,905	17,5	33,86	45,65	74,96	67,58	44,28	7,654		0,7409	0,0001429
NOV	16,1	10,61	20,2	36,57	48,36	77,66	70,28	46,98	10,36	2,706		0,0001429
DEZ	0,5083	5,999	3,592	19,96	31,75	61,06	53,67	30,37	6,25	13,9	16,61	

Fonte: ARAUJO, 2021.

Tabela 50. Análise de variância (ANOVA) do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEB

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	145430,881	11	13220,9892	488,813759	1,9875E-25	2,216308646
Dentro dos grupos	649,130133	24	27,0470889			
Total	146080,011	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 51. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Flavonoides Totais do EEB.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,301	0,9675	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0002463	0,0001447	0,0001429	0,6754	
FEV	3,767		0,964300	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,002766	0,0001462	0,9999
MAR	1,871	1,896		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001452	0,0002242	0,0001429	0,9999
ABR	24,29	28,26	26,36		0,151	0,0001429	0,0001429	0,9779	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAI	28,82	31,59	30,69	4,328		0,0001429	0,0001429	0,01019	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUN	50,31	54,08	52,18	25,82	21,49		0,9884	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	48,68	52,45	50,55	24,19	19,86	1,625		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	22,72	26,49	24,59	1,772	6,1	27,59	25,96		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	8,658	12,42	10,53	15,84	20,16	41,65	40,03	14,06		0,0001429	0,0001429	0,0001431
OUT	10,65	6,887	8,783	35,15	39,48	60,96	59,34	33,38	19,31		0,4082	0,0006664
NOV	14,13	10,36	12,26	38,62	42,95	64,44	62,82	36,85	22,79	3,477		0,0001433
DEZ	2,861	0,9059	0,9902	27,35	31,68	53,17	51,55	25,58	11,52	7,793	11,27	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados obtidos de compostos fenólicos totais foram comparados para verificar se existiam diferenças estatísticas significativas, em um intervalo de confiança de 95%, entre os tipos de tratamentos utilizados nos materiais vegetais. O teste ANOVA *one way* demonstrou haver diferença entre os extratos submetidos à secagem em estufa e ao *quenching* quando comparados no parâmetro teor de compostos fenólicos totais ($F_{\text{calc}} 37,42 > F_{\text{crítico}} 3,98$; valor- $P 4,85 \times 10^{-8} < 0,05$). Em seguida, realizou-se o teste *t* de student que confirmou a diferença entre os tratamentos ($t_{\text{calc}} 6,11 > t_{\text{crít}} 2,00$; valor- $P 7,81 \times 10^{-8} < 0,05$).

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais obtidos dos materiais vegetais de *M. rigida*, estão apresentados na Tabela 52.

Tabela 52. Teores de compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia validada para “Determinação de compostos fenólicos totais” (n = 3), nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia rigida* (Mart) Biral coletadas em Junho de 2018.

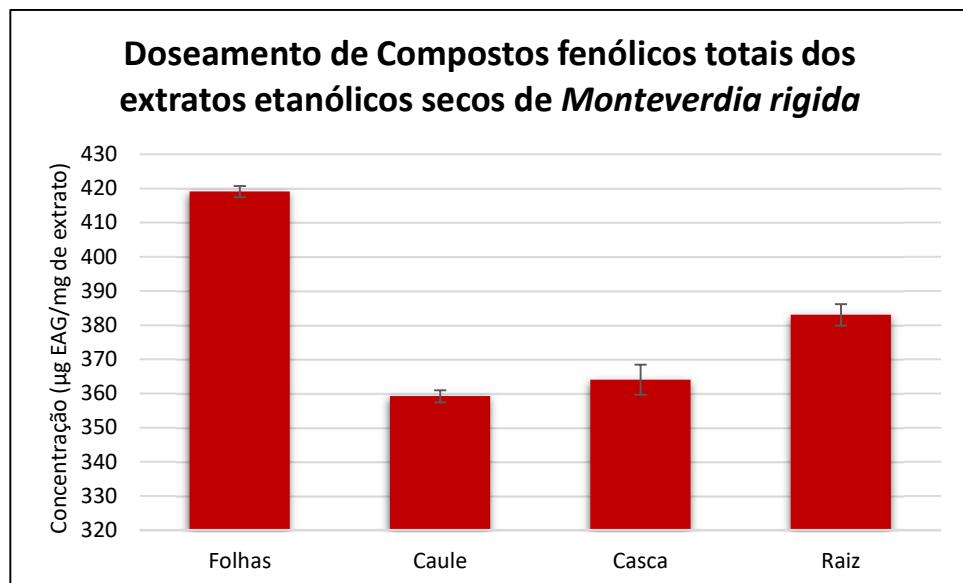
Ensaio	Material analisado	Resultados		Desvio	
		(n = 3) (µg EAG/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Padrão Relativo (DPR%)
Fenólicos totais	Folhas	417,28			
		420,33	419,11	1,61	0,38
		419,71			
	Caule	358,42			
		361,27	359,22	1,79	0,50
		357,96			
	Cascas da raiz	367,86			
		365,13	364,06	4,44	1,22
		359,18			
	Raiz	383,28			
		386,02	383,05	3,10	0,81
		379,84			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Assim como a avaliação de flavonoides totais, os extratos etanólicos secos das folhas, caule, cascas da raiz e cerne da raiz foram submetidos à avaliação da composição fenólica total, foram quantificados diferentes teores de acordo com cada parte avaliada da espécie. Os índices detectados em ordem decrescente foram encontrados nas folhas ($419,11 \pm 1,61$ µg EAG/mg de extrato), raízes ($383,05 \pm 3,10$ µg EAG/mg de extrato), casca das raízes ($364,06 \pm 4,44$ µg EAG/mg de extrato) e caule ($359,22 \pm 1,79$ µg EAG/mg de extrato) (Gráfico 50). A análise estatística por ANOVA one way seguido de pós-teste de Tukey, confirmou haver diferença estatística significativa entre todas as amostras analisadas para um nível de confiança de 95% ($F 252,67 > F_{c\text{ritico}} 4,06$; valor- $P 2,91 \times 10^{-8} < 0,05$) (Tabelas 53 e 54). O teste t foi realizado para comparação dos valores obtidos para os extratos etanólicos obtidos das folhas

de *M. obtusifolia* e *M. rigida* e confirmou a diferença estatística entre os resultados obtidos das diferentes espécies (tcalculado -63,81 < tcritico 4,3; valor-*P* 0,0002 < 0,05).

Gráfico 50. Teores de Compostos fenólicos totais obtidos através da metodologia “Determinação de Compostos fenólicos totais” (*n* = 3) nos extratos etanólicos secos das diferentes partes de *M. rigida*.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± DP.
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 53. Análise de variância (ANOVA) do teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos secos de *Monteverdia rigida*.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor- <i>P</i>	F crítico
Entre grupos	6652,165	3	2217,388	252,6777	2,91506E-08	4,066181
Dentro dos grupos	70,20447	8	8,775558			
Total	6722,369	11				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; *p*-valor: probabilidade exata.
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 54. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o parâmetro Fenólicos totais dos extratos etanólicos secos de *Monteverdia rigida*.

	Folhas	Caule	Casca Raiz	Raiz
Folhas		0,000231	0,000231	0,000231
Caule	35,02		0,2639	0,000252
Casca Raiz	32,19	2,83		0,000416
Raiz	21,08	13,93	11,1	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais encontrados nas plantas, derivam da via dos fenilpropanóides e têm sido o foco de muitas descobertas sobre os mecanismos de defesa das plantas para patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus, grandes estresses abióticos como seca, salinidade, herbivoria e radiação UV (BABENKO *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos exibem propriedades antimicrobianas e antioxidantes que ajudam as plantas a evitar infecções patogênicas, bem como a proteger os principais tecidos dos efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio. A rápida suprarregulação de genes na via fenilpropanóide e o acúmulo de fenólicos podem ser observados em resposta ao estresse ambiental (KUMAR *et al.*, 2020).

A quantidade de compostos fenólicos nas folhas e caule de *M. rigida* foi avaliada por Neri (2016) que relatou a presença de 434,36 µg EAG/mg extrato das folhas e 340,77 µg EAG/mg extrato do caule da espécie. Estes valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo, levando-se em consideração os fatores ambientais como índice pluviométrico, temperatura e radiação solar das diferentes localidades de coleta. Entretanto, ao avaliar o extrato da raiz desta espécie, utilizando a mesma metodologia para quantificação e mesmo padrão externo, Pereira *et al.* (2020) verificaram a presença de 59 µg EAG/mL extrato, valor considerado inferior ao encontrado para o extrato do referido material vegetal neste estudo.

Silva *et al.* (2009) constataram o alto índice fenólico no extrato etanólico das raízes de *M. imbricata* (422,57 mg EAG/mg extrato).

Amparados no conhecimento etnofarmacológico, Lima, Vargas e Pohlit (2010) avaliaram o teor de fenólicos totais do caule de *M. guyanensis* com vistas a correlacionar estes compostos à potencial atividade anti-inflamatória e antiagregante plaquetária e verificaram a presença de 58,7 mg EAG/mg extrato etanólico. De modo semelhante, ao avaliar extratos do caule da espécie *M. dhofarensis*, utilizada no oriente médio para o tratamento de feridas e antiséptica, Weli *et al.* (2019) verificaram a presença de 97,74 µg EAG/mg extrato etanólico e 167 µg EAG/mg extrato obtido com acetato de etila, confirmado comportamento observado por outros pesquisadores.

Em estudo realizado por Moteriya *et al.* (2014) com a espécie *M. emarginata*, foi possível observar comportamento contrário ao encontrado em *M.*

rigida, em que os teores de compostos fenólicos presentes nos extratos metanólico (96 µg EAG/mg extrato) e aquoso (55 µg EAG/mg extrato) do caule foram superiores aos encontrados nos extratos metanólico (92 µg EAG/mg extrato) e aquoso (25 µg EAG/mg extrato) das folhas. Gupta e Sharma (2012), em estudo prévio, haviam relatado o conteúdo fenólico total no extrato hidroalcóolico (80% etanol) das folhas de *M. emarginata* (10,69 mg EAG/g material vegetal).

Sagwan, Rao e Sharma (2011), avaliando a espécie *M. emarginata* relataram maiores teores de compostos fenólicos nos extratos metanólicos das raízes (0,72 mg EAG/g material vegetal), seguidos de folhas (0,49 mg EAG/g material vegetal) e caule (0,32 mg EAG/g material vegetal).

Os diferentes valores observados podem ser provenientes de processos distintos, tamanhos de partícula, proporções droga:solvente e tempos de extração. Em estudo realizado por Abreu-Naranjo *et al.* (2018), foram avaliados diferentes fatores, como os citados anteriormente, para a espécie *M. macrocarpa* e foi possível verificar que a temperatura, tamanho de partícula e o tempo de extração são fundamentais para a otimização da metodologia de quantificação de compostos fenólicos.

O local da coleta também pode interferir no teor dos compostos fenólicos. De acordo com o estudo realizado por Schindler *et al.* (2020), utilizando a espécie *M. ilicifolia*, foi possível verificar diferentes índices de metabólitos a partir de distintas origens do material vegetal. Os valores obtidos dos extratos etanólicos das folhas variaram de 273 mg EAG/g extrato a 551 mg EAG/g extrato.

Os valores de compostos fenólicos totais encontrados para as diferentes partes de *M. rigida* confirmam a riqueza polifenólica da espécie e destacam a presença recorrente destes compostos nas diversas espécies vegetais do gênero *Monteverdia*.

5.2.8 Determinação de contaminação microbiológica

Os resultados obtidos através das metodologias farmacopéicas de “Determinação do número total de microrganismos mesofílicos” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “*Escherichia coli*”,

“*Salmonella*”, “*Pseudomonas aeruginosa*”, “*Staphylococcus aureus*” e “*Candida albicans*” para as drogas vegetais de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral e *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral estão apresentados nas Tabelas 54 e 55.

Tabela 55. Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “*Escherichia coli*”, “*Salmonella*”, “*Pseudomonas aeruginosa*”, “*Staphylococcus aureus*” e “*Candida albicans*” para as drogas vegetais de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral.

Junho	1024	881	10	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Julho	904	792	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Agosto	689	328	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Setembro	770	501	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Outubro	806	498	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Novembro	523	378	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Dezembro	618	403	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Legenda: *(BRASIL, 2019a); ** PINTO; KANEKO; OHARA, 2010.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 56. Teores de contaminação microbiana obtidos através das metodologias para “Contagem total de bactérias”, “Contagem total de fungos e leveduras” e pesquisa de patógenos “Bactérias gram-negativas bile tolerantes”, “*Escherichia coli*”, “*Salmonella*”, “*Pseudomonas aeruginosa*”, “*Staphylococcus aureus*” e “*Candida albicans*” para as drogas vegetais de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral.

	Bactérias mesofílicas	Fungos e leveduras	Bactérias gram-negativas bile tolerantes	Bactérias				
				<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Especificação	<100.000 UFC/g*	<1000 UFC/g*	<1000 UFC/g*	Ausente*	Ausente*	Ausente**	Ausente**	Ausente**
Folhas	822	380	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Caule	684	424	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Casca da Raiz	928	706	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Raiz	746	502	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Legenda: *(BRASIL, 2019a); **PINTO; KANEKO; OHARA, 2010.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os resultados obtidos para determinação de contaminação microbiológica para os materiais vegetais de *M. obtusifolia* e *M. rigida* demonstraram conformidade com todos os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 6^a edição (PINTO; KANEKO; OHARA, 2010; BRASIL, 2019a) para droga vegetal (rasurada ou triturada) que não será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana. De acordo com as especificações, as análises para determinação de microrganismos mesofílicos totais devem apresentar valores inferiores a 100.000 UFC/g para a contagem de bactérias totais e 1000 UFC/g para contagem de fungos e leveduras totais. Além da pesquisa por patógenos como bactérias gram-negativas bile tolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

A avaliação microbiológica de drogas vegetais tem como objetivo assegurar o consumo adequado e de produtos de qualidade, com garantia de ausência ou controle de patógenos, confirmando a sua utilidade (GINDRI; LAPORTA; SANTOS, 2012). Em geral, as matérias-primas de origem natural são mais susceptíveis a apresentarem problemas de contaminação. Fatores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem, estocagem e microbiota natural são importantes e devem ser considerados, por permitirem altos níveis de contaminação microbiana, por vezes patogênicas, que podem comprometer não somente o material, como também o usuário final (MIGLIATO *et al.*, 2007; KOSALEC; CVEK; TOMIĆ, 2009).

De acordo com Andrade *et al.* (2005), ao avaliar medicamentos para administração por via oral contendo matéria-prima vegetal, foi possível detectar que 10,5% das amostras analisadas estavam fora das especificações. De modo semelhante, Schutz, Velazquez e Abegg (2008) também observaram a presença de contaminação microbiológica ou bactérias patogênicas acima dos limites permitidos em 37 % das amostras de origem vegetal avaliadas. Ainda de acordo com os autores foram verificadas a presença de *Escherichia coli* em (7,4%) e *Staphylococcus aureus* em (22,2%) das amostras avaliadas.

Zaroni *et al.* (2004) observaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em 23,61% e *Escherichia coli* em 22,2% das amostras de origem vegetal analisadas. Avaliando amostras de fitoterápicos vendidos em farmácias do Rio de Janeiro, Faria *et al.* (2012) observaram que das 30 amostras analisadas, 22

possuíam contaminação por bactérias aeróbias totais, enquanto nove amostras encontravam-se acima dos padrões preconizados para fungos e leveduras. Em relação à contagem total de outras enterobactérias, 19 amostras apresentaram contaminação acima das especificações.

A contaminação em fitoterápicos é um problema que tem persistido ao longo do tempo, e o seu monitoramento microbiológico fornece base para ações de Vigilância Sanitária. Nesse contexto, o monitoramento desses medicamentos é relevante ferramenta para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia desses produtos.

Em contrapartida, ao avaliar 40 amostras de matérias-primas de fitoterápicos de farmácias de manipulação do Rio Grande do Sul, Gindri, Laporta e Santos (2012) observaram que existia presença de microrganismos nas amostras, entretanto, em nenhuma delas, o valor de UFC/g ultrapassou os limites estabelecidos para fitoterápicos na Farmacopeia Britânica. Para o teste de pesquisa e identificação de patógenos, comprovou-se que não havia a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nas amostras analisadas. Confirmado, desta forma, que o cuidado na coleta e processamento do material vegetal, influenciam positivamente na qualidade microbiológica das amostras.

5.3 Validação de metodologia analítica

5.3.1 Especificidade

A especificidade teve como objetivo avaliar a capacidade do método em identificar e separar os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina das demais substâncias presentes na matriz.

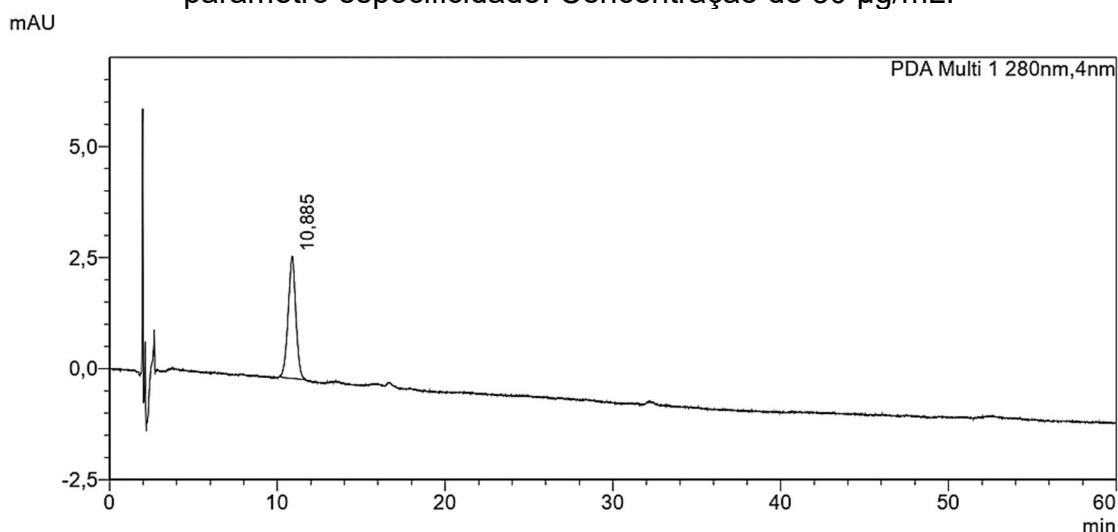
A análise dos cromatogramas obtidos dos padrões, amostra, fase móvel, solução diluente e etanol 96% demonstraram que não existem picos coelhindo com os picos dos padrões (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina conforme pode ser observado nas Figuras 19 a 25, respectivamente. Para confirmação dos tempos de retenção e comparação dos marcadores com a amostra, foram realizadas fortificações nas soluções preparadas a partir do extrato etanólicos de *M. obtusifolia* (Figura 26).

Em adição, foram avaliadas a pureza dos marcadores e do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart., obtidos por CLAE-DAD, observando-se 99,93% para a (-)-Epigalocatequina, 99,80% para a (+)-Catequina e 97,28% para a (-)-Epicatequina (Figuras 27, 28 e 29).

Os resultados obtidos na avaliação de pureza dos picos dos marcadores demonstraram que não existem outros compostos químicos, no intervalo do espectro de 190 a 800 nm, coeluindo nos tempos de retenção dos marcadores para o comprimento de onda utilizado no método analítico.

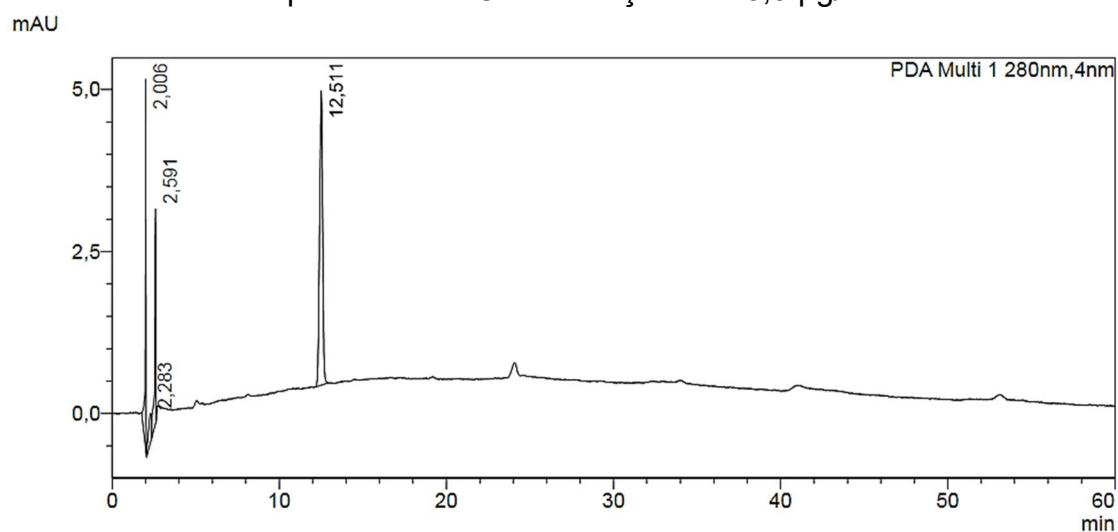
Desta forma, é possível concluir que o método proposto para doseamento dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* Mart., é específico.

Figura 19. Cromatograma do padrão (-)-Epigalocatequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 30 µg/mL.



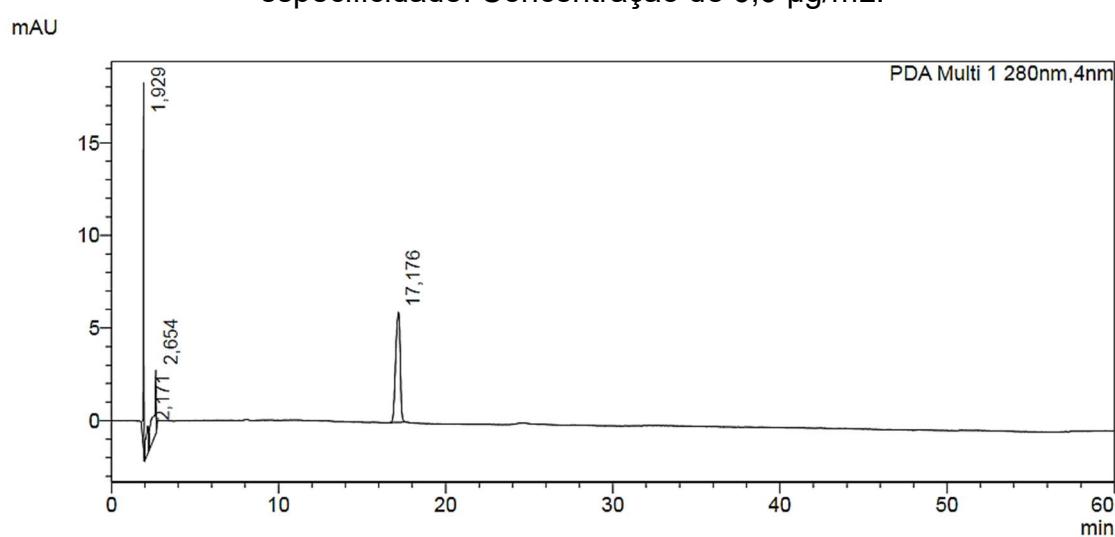
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 20. Cromatograma do padrão (+)-Catequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 13,5 µg/mL.



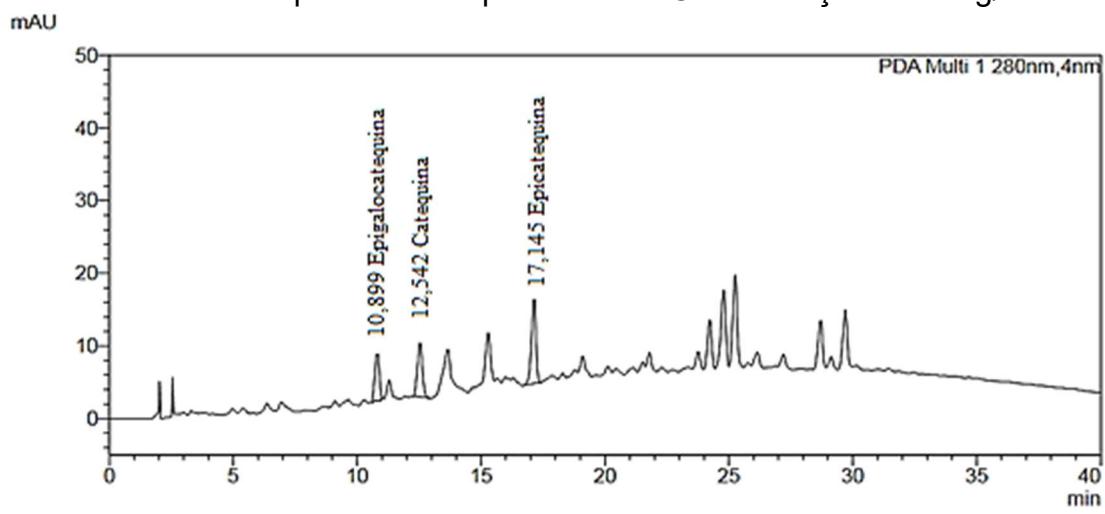
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 21. Cromatograma do padrão (-)-Epicatequina avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 6,6 µg/mL.



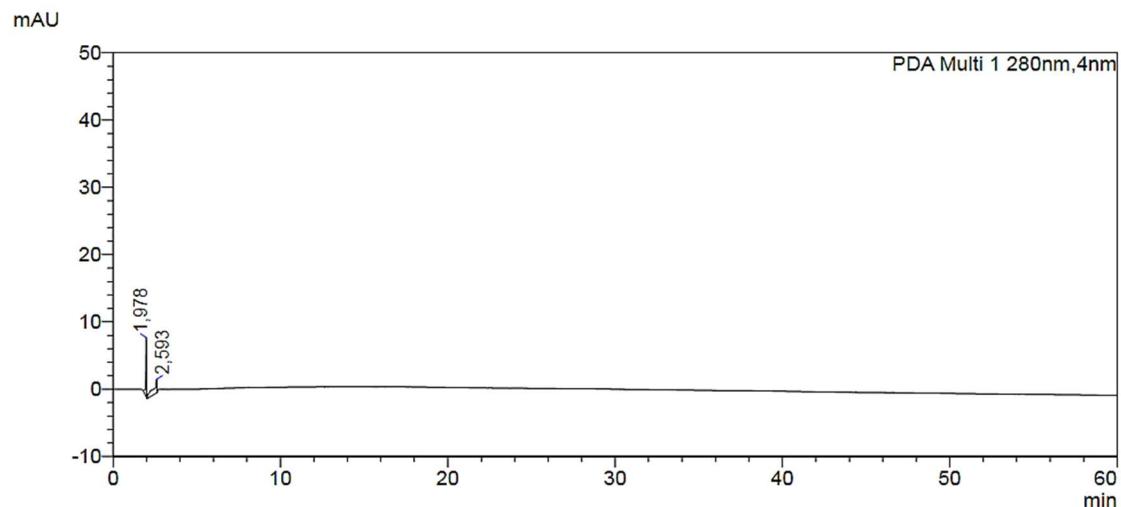
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 22. Cromatograma do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. avaliado no parâmetro especificidade. Concentração de 1 mg/mL.



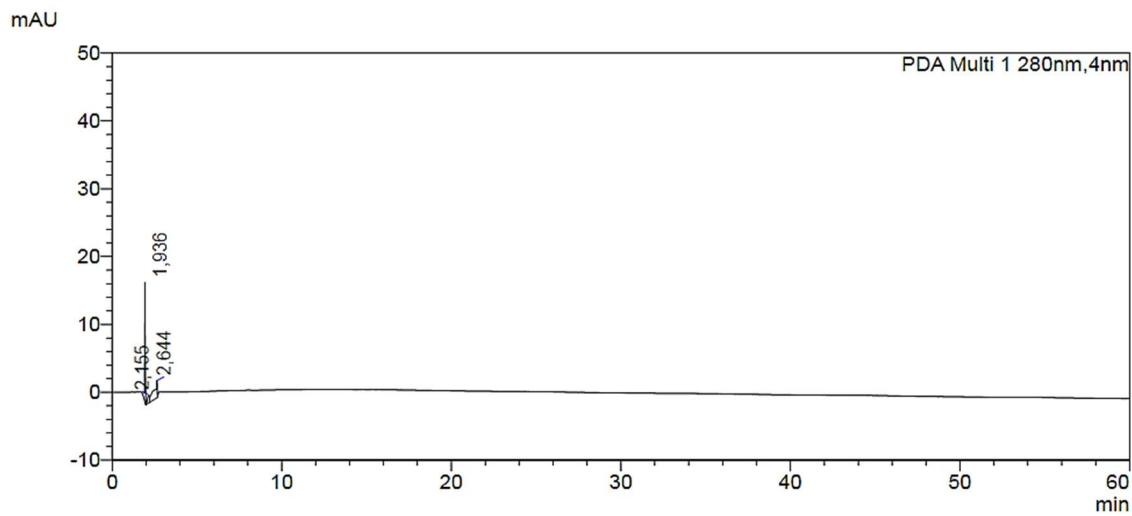
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 23. Cromatograma da fase móvel avaliada no parâmetro especificidade.



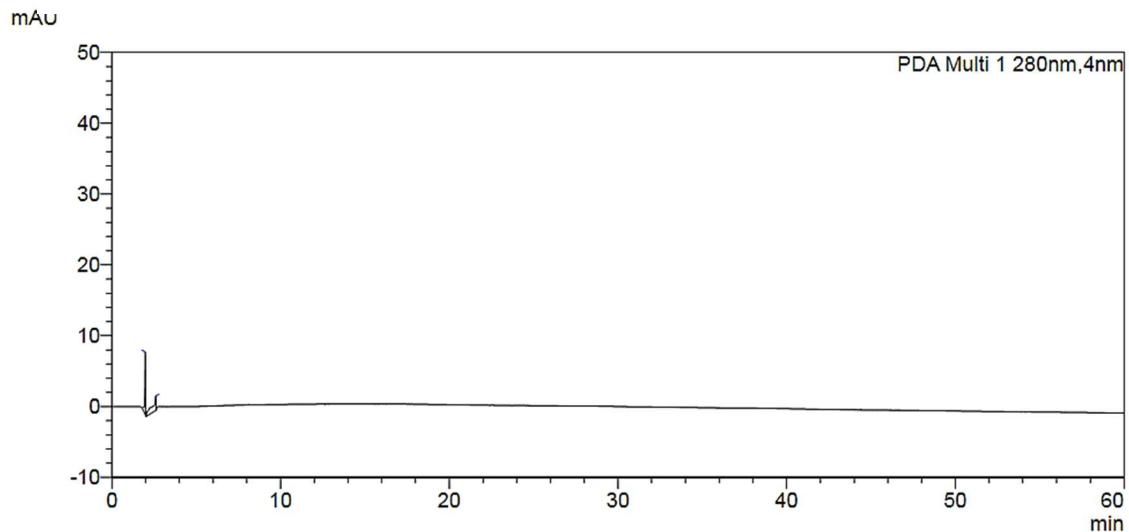
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 24. Cromatograma do solvente extrator avaliado no parâmetro especificidade.



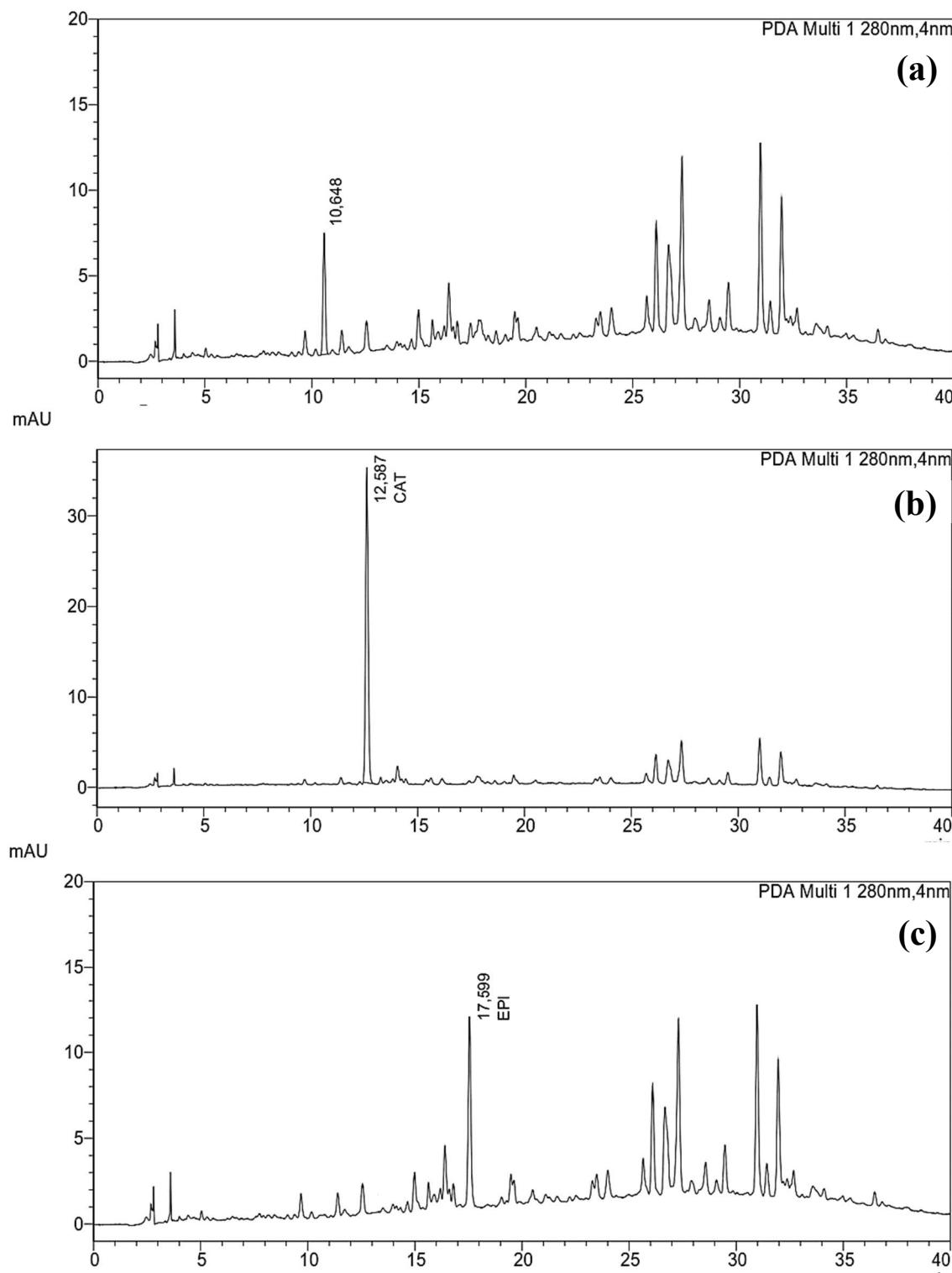
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 25. Cromatograma da solução diluente avaliada no parâmetro especificidade.



Fonte: ARAÚJO, 2021

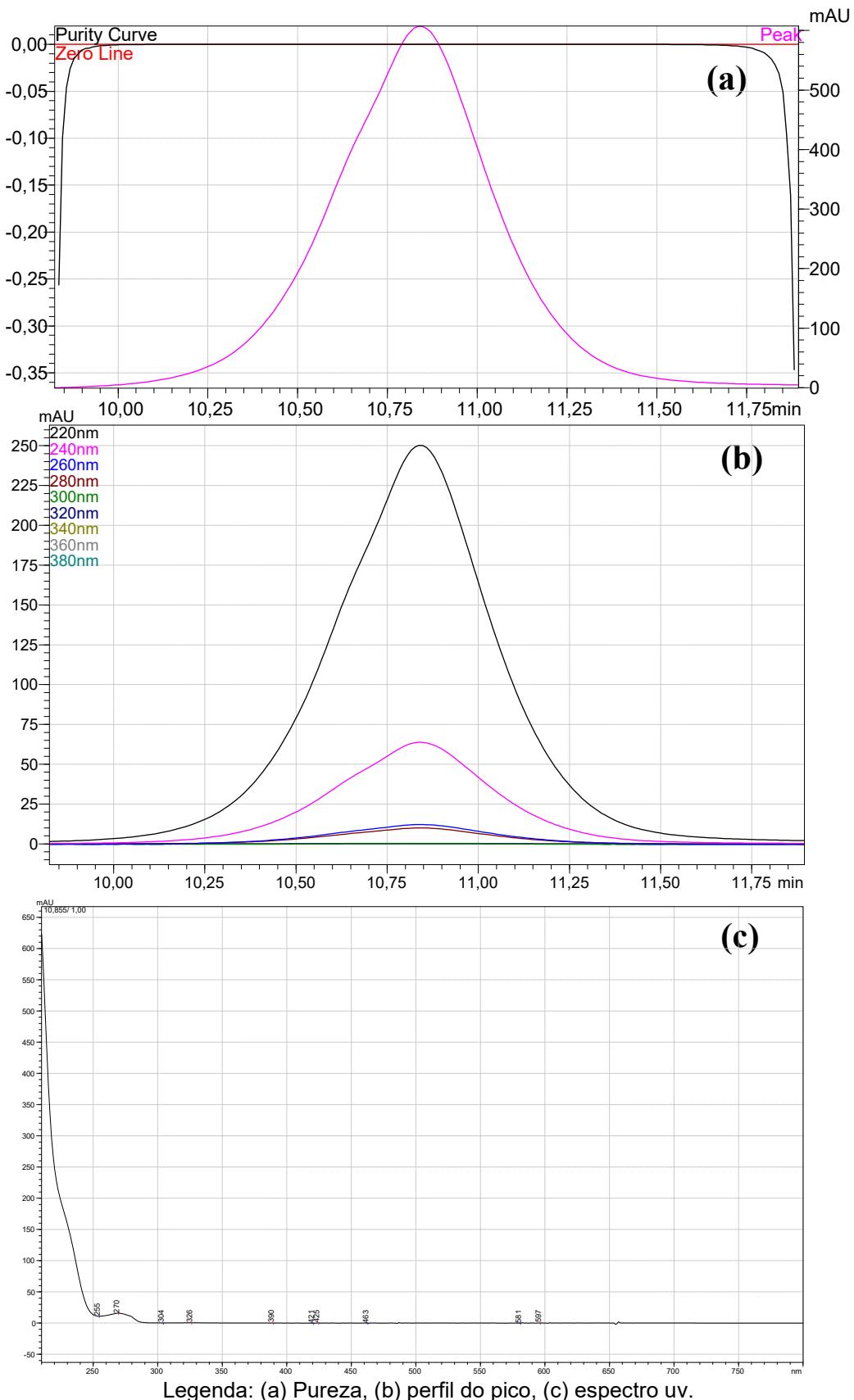
Figura 26. Figura 33. Cromatogramas do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral avaliados no parâmetro especificidade. Concentração de 1 mg/mL com adição de padrões.



Legenda: (a) (-)-Epigalocatequina, (b) (+)-Catequina, (c) (-)-Epicatequina.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

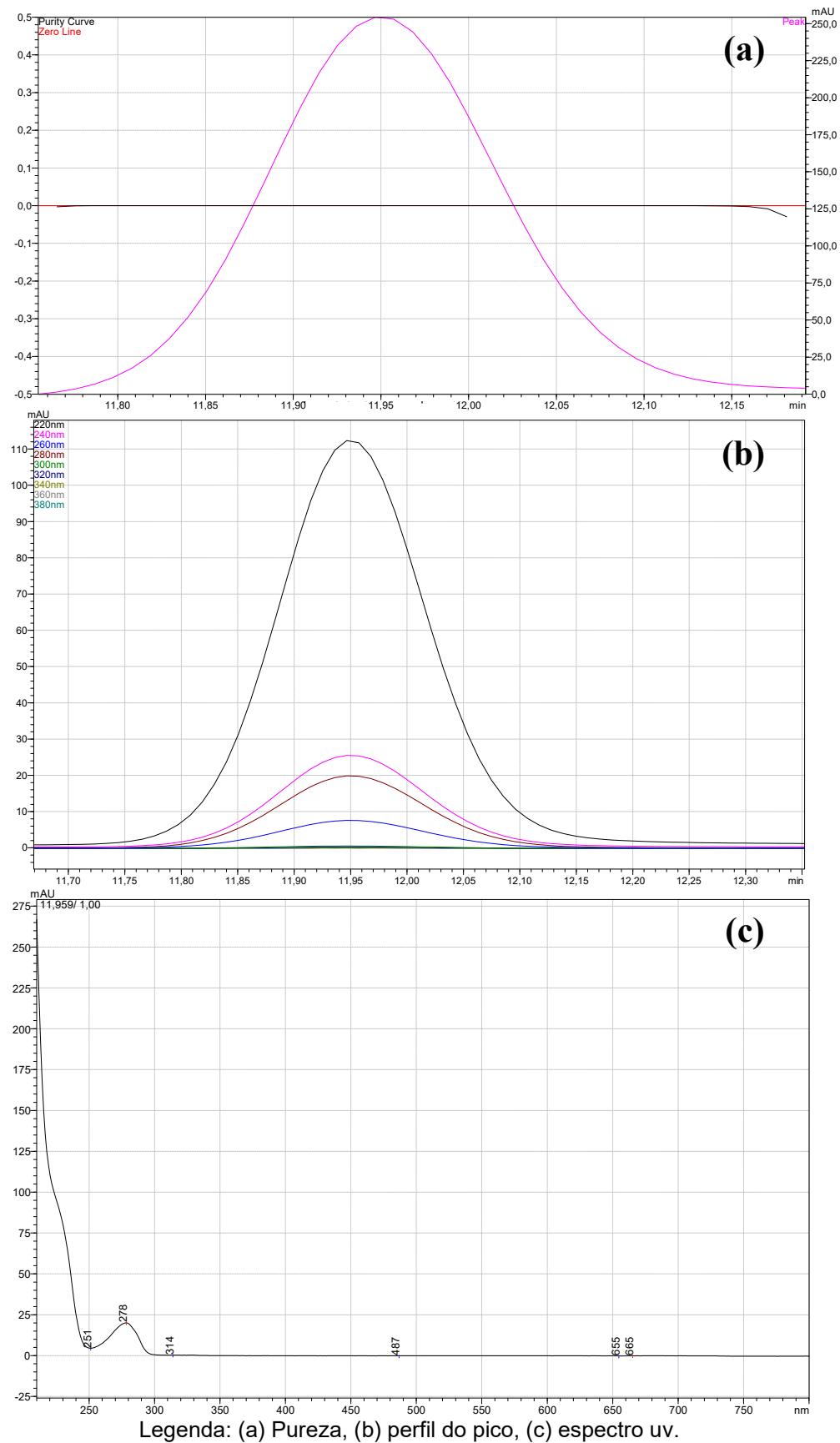
Figura 27. Pureza espectral de pico do marcador (-)-Epigallocatequina.



Legenda: (a) Pureza, (b) perfil do pico, (c) espectro uv.

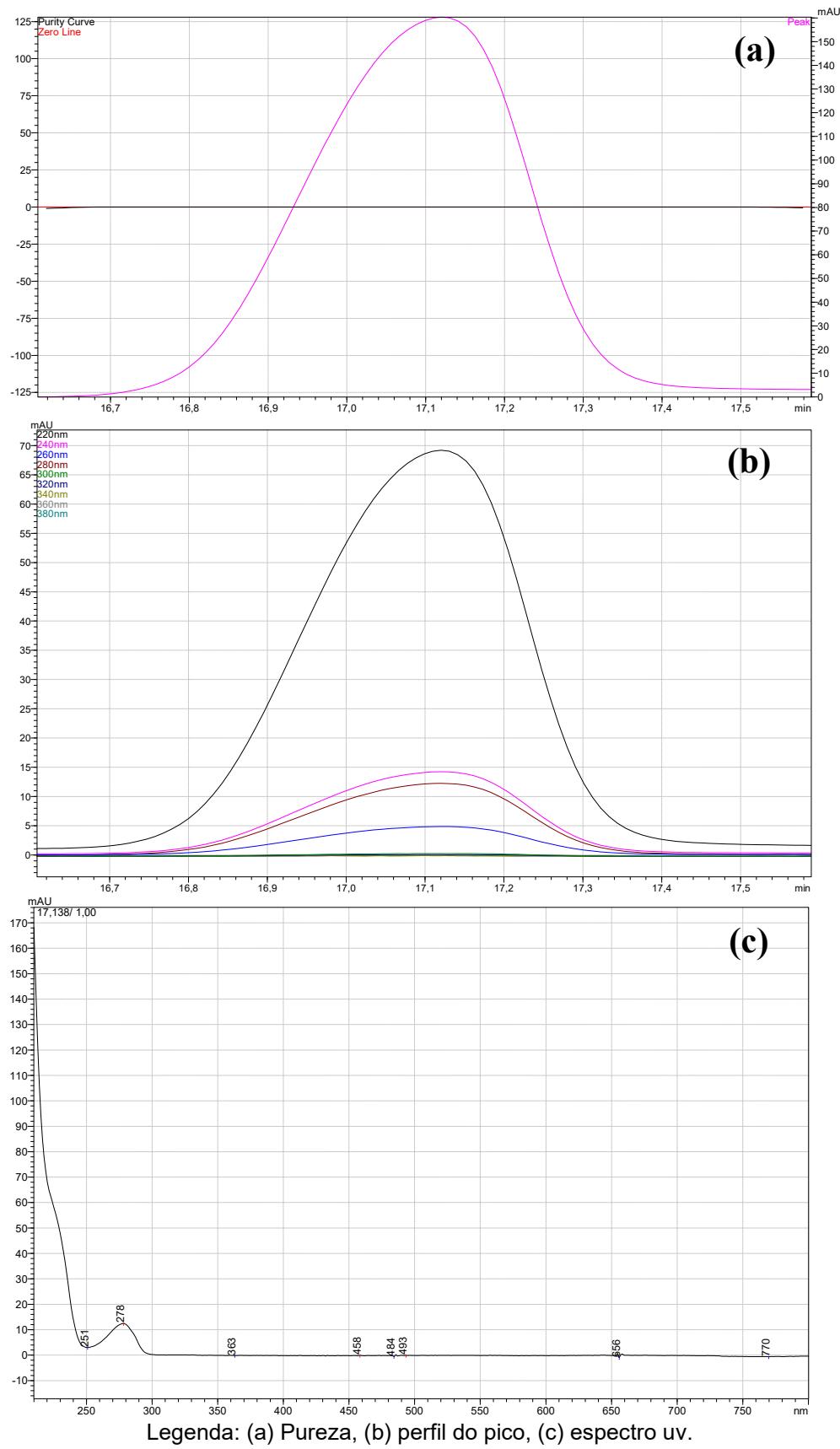
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 28. Pureza de pico do marcador (+)-Catequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 29. Pureza de pico do marcador (-)-Epicatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção de curvas de calibração, por padronização externa, utilizando as substâncias químicas de referência dos marcadores (-)-Epigalocatequina (9 µg/mL a 90 µg/mL), (+)-Catequina (4,05 µg/mL a 40,5 µg/mL) e (-)-Epicatequina (3,3 µg/mL a 13,2 µg/mL), respectivamente.

O método dos mínimos quadrados é utilizado para estabelecer a curva de calibração. As amostras analisadas foram padrões contendo somente o composto examinado, nas concentrações trabalho de acordo com o estabelecido na parte experimental deste estudo. A curva de calibração foi preparada com os resultados de diferentes concentrações e a média de n repetições por nível de concentração. A análise de variância da regressão levou à determinação da existência de um coeficiente angular significativo e à validade da reta de regressão.

A Tabela 57 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epigalocatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=3$) e forneceu a equação da reta ($y = 2800,9x - 1252,5$). O valor de F ($396947,5 > F$ significação ($4,88 \times 10^{-54}$)) e valor- P ($4,88 \times 10^{-54} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos 51 e 52. A sobreposição de cromatogramas do marcador (-)-Epigalocatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (9 – 90 µg/mL), está disposta na Figura 30 (p. 108).

A Tabela 58 apresenta os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (+)-Catequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=3$) e forneceu a equação da reta ($y = 7426,2x + 608,9$). O valor de F ($291284,1 > F$ significação ($2,33 \times 10^{-54}$)) e valor- P ($2,33 \times 10^{-54} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos 53 e 54. A sobreposição de cromatogramas do marcador (+)-Catequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (4,05 – 40,5 µg/mL), está disposta na Figura 31.

A Tabela 59 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epicatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9997 ($n=3$) e forneceu a equação da reta ($y = 17877x - 10591$). O valor de

$F(30078,8) > F$ significação ($7,23 \times 10^{-32}$) e valor-P ($7,22 \times 10^{-32} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos 55 e 56. A sobreposição de cromatogramas do marcador (-)-Epicatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (3,30 – 13,2 $\mu\text{g/mL}$), está disposta na Figura 32.

Estes resultados estão de acordo com a recomendação da ANVISA para validação de metodologias analíticas (RE nº 899/2003 e RDC 166/2017), na qual o valor mínimo do coeficiente de correlação deve ser 0,99 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

A tabela 60 (p. 110) resume as equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

De acordo com os pressupostos da regressão, os resíduos devem distribuir-se aleatoriamente em torno de 0, tanto no modelo global como em relação a cada variável. Caso tal situação não se verifique, será necessário alterar o modelo adotado (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

Estudos realizados por Danzer & Currie (1998) e Miller (1991), demonstraram que a análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedastidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas.

Os cálculos dos resíduos de cada marcador confirmaram a validade do modelo de calibração adotado, observando-se distribuição aleatória de resíduos próximos à média zero, homocedasticidade e ausência de amostras atípicas conforme Gráficos 52, 54 e 56.

A avaliação estatística dos dados por ANOVA *one way* permitiu observar que $F_{\text{calc}} > F_{\text{significação}}$ e $\text{valor-p} < 0.05$ para todos os marcadores, indicando que há correlação linear estatística entre os dados, ou seja, a equação linear proposta é adequada para descrever os dados experimentais, uma vez que os valores observados experimentalmente não diferem daqueles previstos pela equação (INDRAYANTO, 2018).

O método proposto para o doseamento de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart. é linear, pois todos os marcadores apresentaram curvas-padrão com

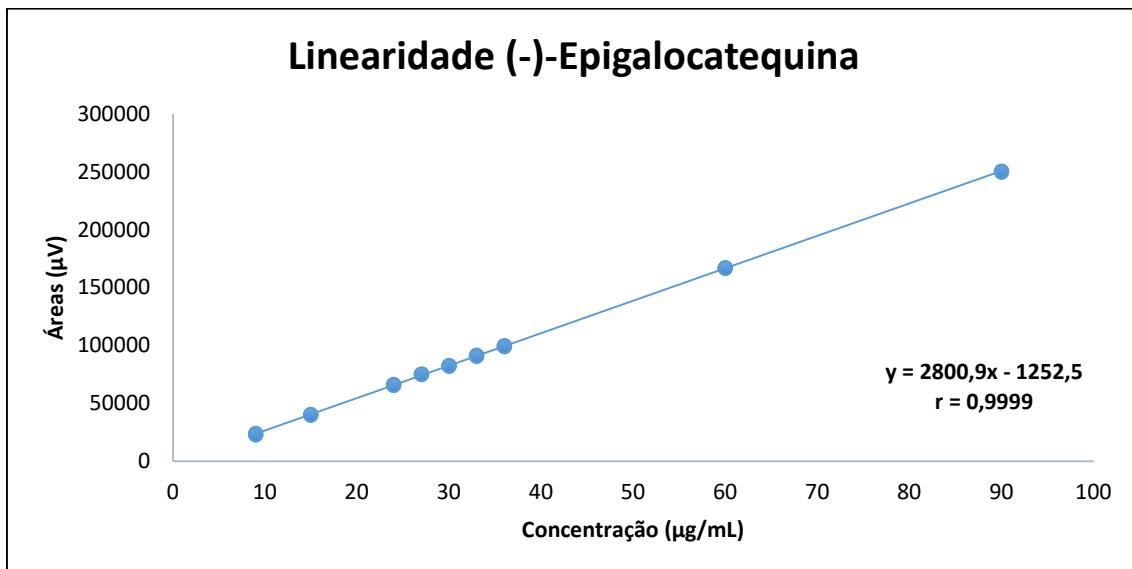
coeficiente de correlação superior a 0,99, confirmados pela análise dos resíduos, estando em acordo com a especificação estabelecida na resolução nº 899/2003 e RDC Nº 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

Tabela 57. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epigalocatequina (n=3).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
30% (9 µg/mL)	1	24187			
	2	23130	23458,33	8,82 µg/mL	2,69
	3	23058			
50% (15 µg/mL)	1	40452			
	2	40117	40326,67	14,84 µg/mL	0,45
	3	40411			
80% (24 µg/mL)	1	66627			
	2	65869	66065	24,03 µg/mL	0,75
	3	65699			
90% (27 µg/mL)	1	75012			
	2	75366	75226,33	27,31 µg/mL	0,25
	3	75301			
100% (30 µg/mL)	1	82273			
	2	82701	82639,67	29,95 µg/mL	0,41
	3	82945			
110% (33 µg/mL)	1	91815			
	2	91222	91354,67	33,06 µg/mL	0,45
	3	91027			
120% (36 µg/mL)	1	100153			
	2	99442	99598	36,01 µg/mL	0,50
	3	99199			
200% (60 µg/mL)	1	167313			
	2	167102	167145	60,12 µg/mL	0,09
	3	167020			
300% (90 µg/mL)	1	250500			
	2	250033	250421,3	89,85 µg/mL	0,14
	3	250731			

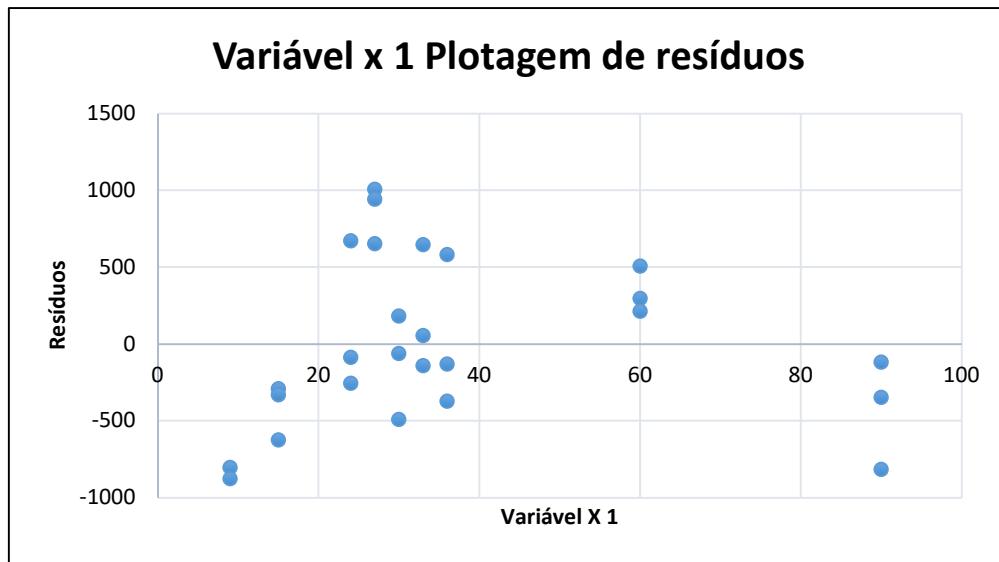
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 51. Regressão linear da curva de calibração (9 – 90 µg/mL) para o marcador (-)-Epigalocatequina.



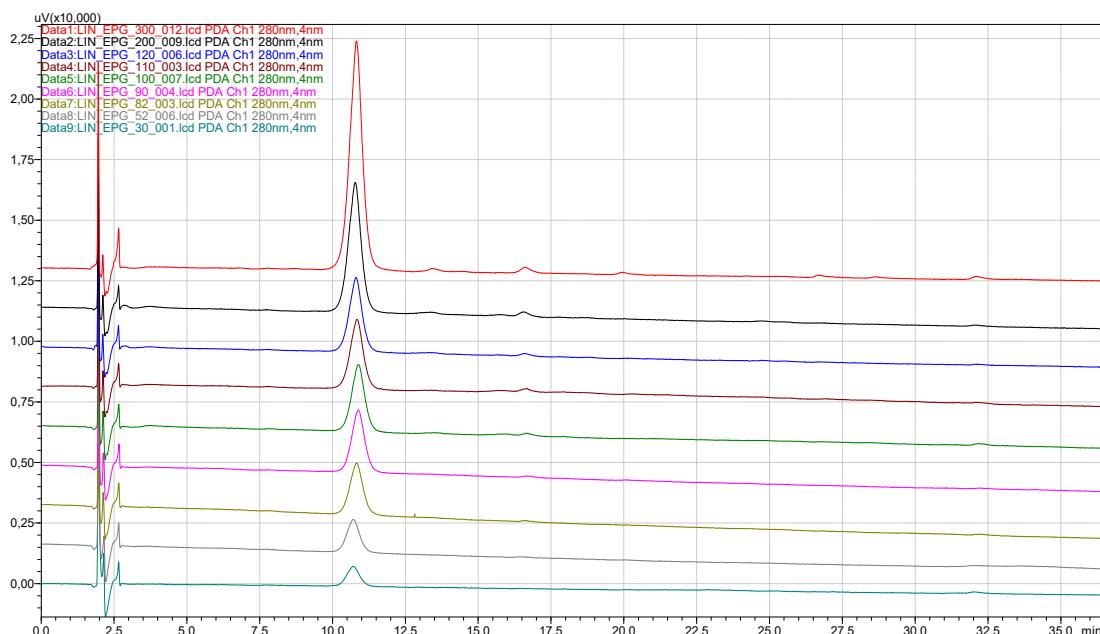
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 52. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epigalocatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 30. Cromatogramas sobrepostos da (-)-Epigallocatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (9 – 90 µg/mL).



Fonte: ARAÚJO, 2021.

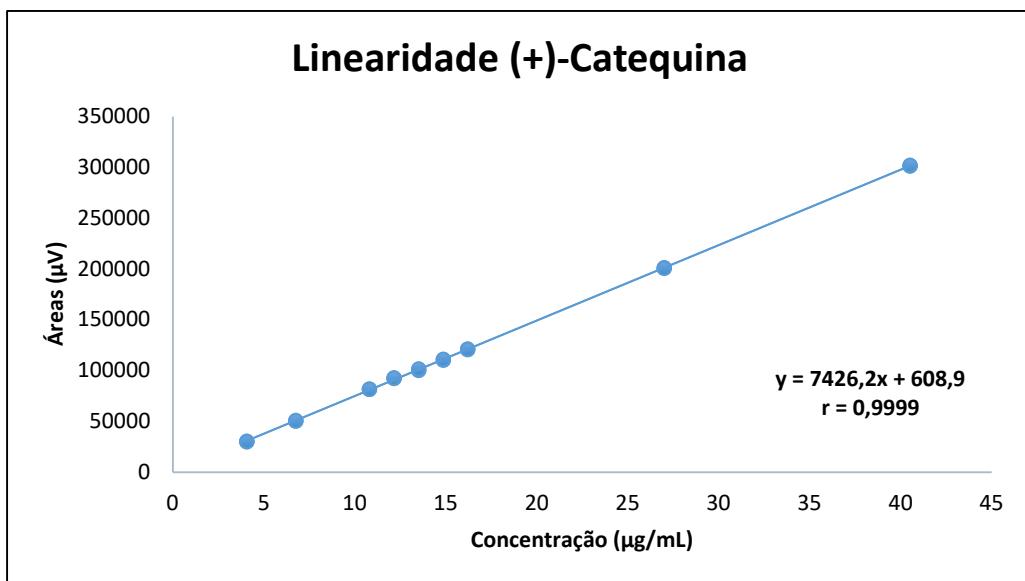
Tabela 58. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (+)-Catequina (n=3).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
30% (4,05 µg/mL)	1	30135			
	2	29799	29985,33	3,96 µg/mL	0,57
	3	30022			
50% (6,75 µg/mL)	1	50225			
	2	50782	50375	6,70 µg/mL	0,70
	3	50118			
80% (10,8 µg/mL)	1	81317			
	2	81615	81411,67	10,88 µg/mL	0,22
	3	81303			
90% (12,15 µg/mL)	1	92556			
	2	92121	92388	12,36 µg/mL	0,25
	3	92487			
100% (13,5 µg/mL)	1	100450			
	2	100043	100713,3	13,48 µg/mL	0,83
	3	101647			
110% (14,85 µg/mL)	1	110495			
	2	110976	110497,3	14,80 µg/mL	0,43
	3	110021			

120% (16,2 µg/mL)	1	120540	120756,3	16,18 µg/mL	0,23
	2	121063			
	3	120666			
200% (27,0 µg/mL)	1	200915	200652,7	26,94 µg/mL	0,13
	2	200654			
	3	200389			
300% (40,5 µg/mL)	1	301365	301439	40,51 µg/mL	0,09
	2	301207			
	3	301745			

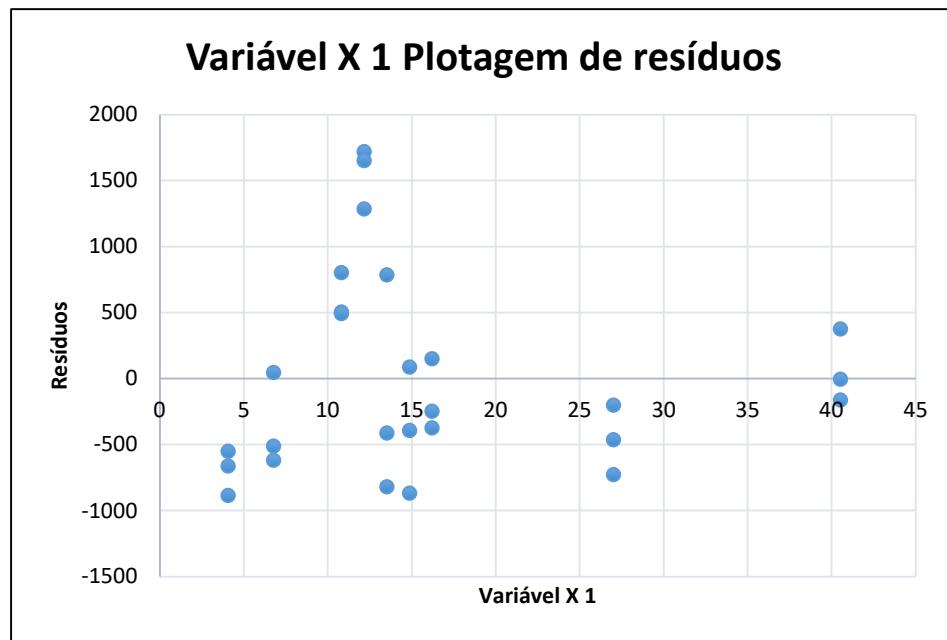
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 53. Regressão linear da curva de calibração (4,05 – 40,5 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 54. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (+)-Catequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 31. Cromatogramas sobrepostos da (+)-Catequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (4,05 – 40,5 µg/mL).

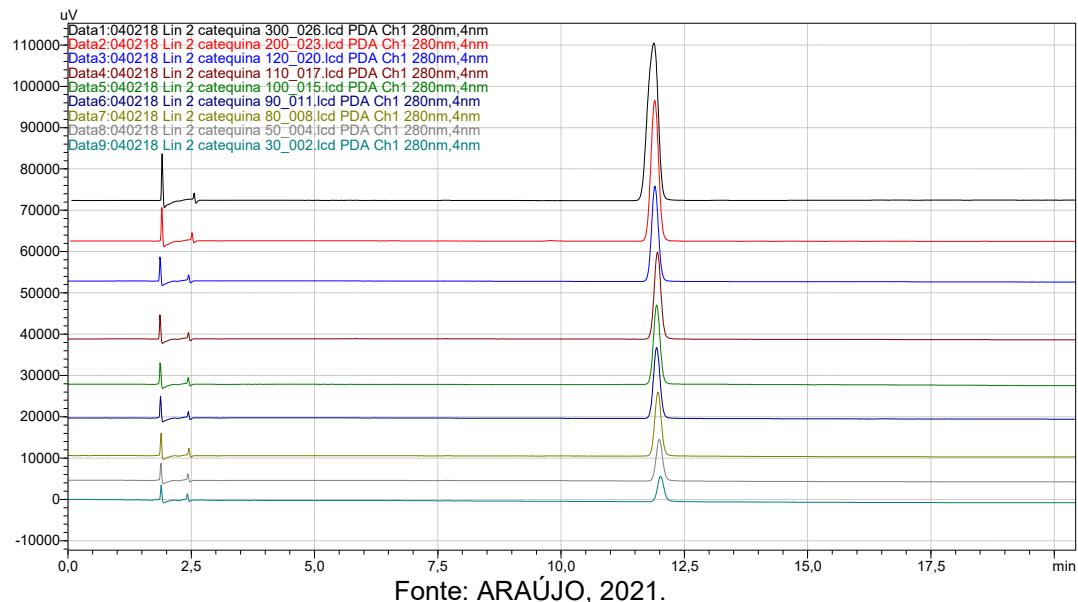
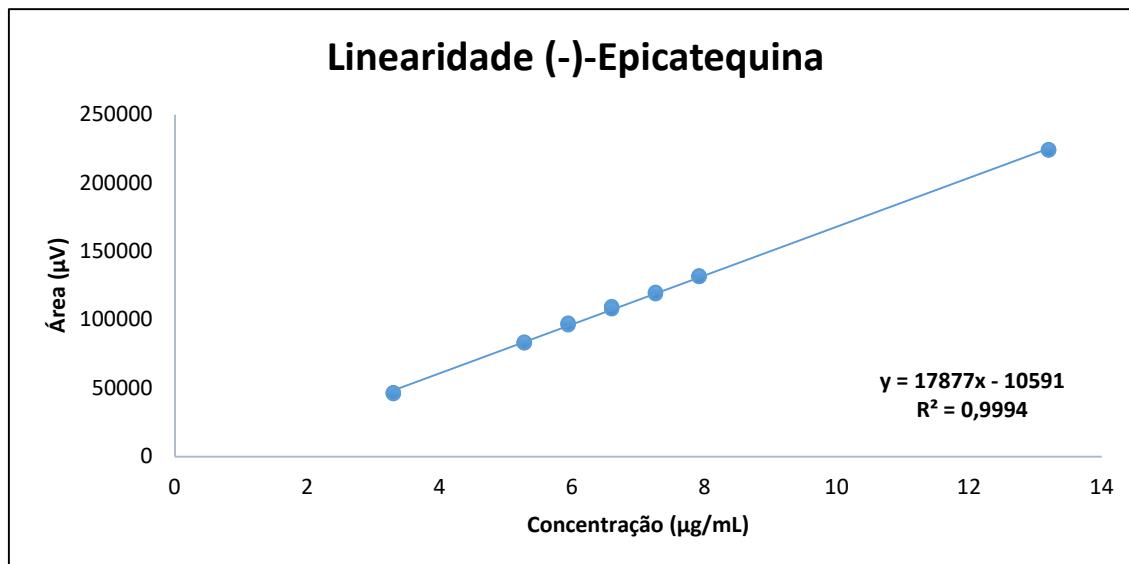


Tabela 59. Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epicatequina (n=3).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
50% (3,30 µg/mL)	1	46535	46265	3,18 µg/mL	0,62
	2	45962			
	3	46298			
80% (5,28 µg/mL)	1	83096	83345	5,25 µg/mL	0,39
	2	83230			
	3	83709			
90% (5,94 µg/mL)	1	96303	96965,67	6,02 µg/mL	0,63
	2	97496			
	3	97098			
100% (6,60 µg/mL)	1	108608	108690	6,67 µg/mL	0,77
	2	109567			
	3	107895			
110% (7,26 µg/mL)	1	119976	119609,3	7,28 µg/mL	0,42
	2	119031			
	3	119821			
120% (7,92 µg/mL)	1	131570	131744,7	7,96 µg/mL	0,16
	2	131983			
	3	131681			
200% (13,2 µg/mL)	1	224114	224176	13,13 µg/mL	0,02
	2	224201			
	3	224213			

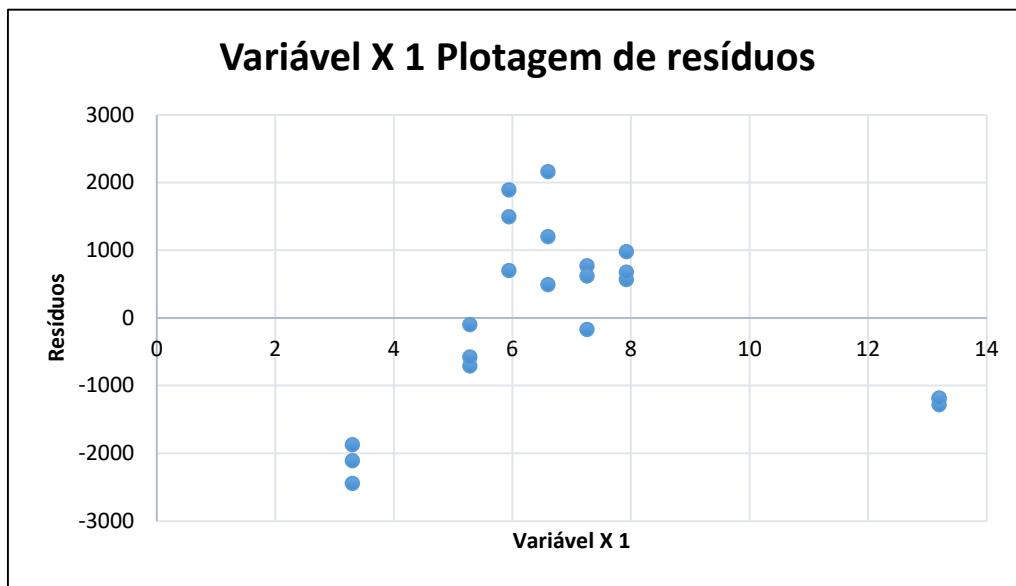
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 55. Regressão linear da curva de calibração (3,3 – 13,2 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.



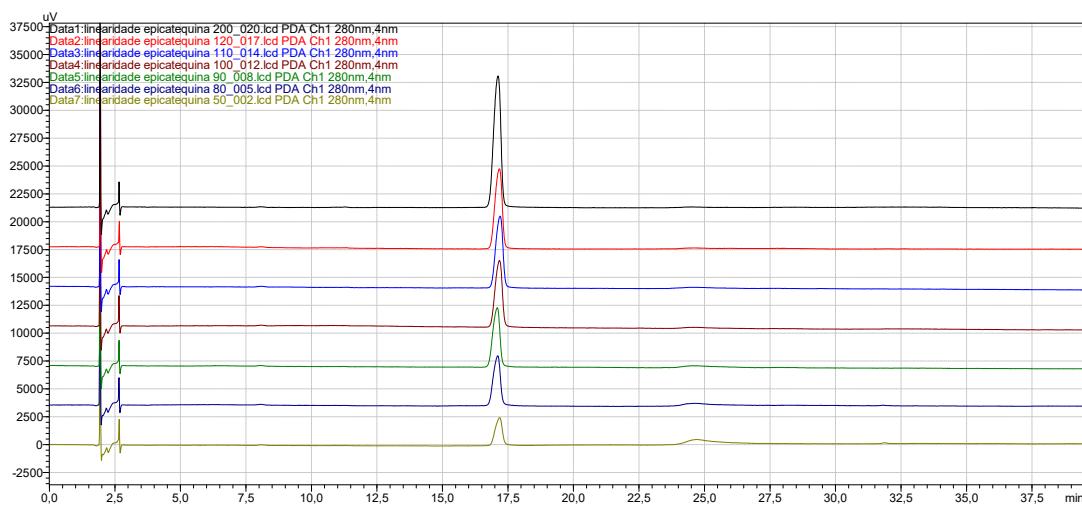
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 56. Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epicatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 32. Cromatogramas sobrepostos da (-)-Epicatequina, nas concentrações utilizadas no estudo de linearidade (3,30 – 13,2 µg/mL).



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 60. Equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

Marcador	Repetição	Equação da reta
(-)-Epigalocatequina	1	$y = 2797,3x - 887,93$
	2	$y = 2799,4x - 1336,2$
	3	$y = 2806,1x - 1533,3$
	Média	$y = 2800,9x - 1252,5$
(+)-Catequina	1	$y = 7427,4x + 565,26$
	2	$y = 7421,4x + 584,74$
	3	$y = 7429,8x + 676,7$
	Média	$y = 7426,2x + 608,9$
(-)-Epicatequina	1	$y = 17873x - 10646$
	2	$y = 17888x - 10566$
	3	$y = 17871x - 10561$
	Média	$y = 17877x - 10591$

Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.3.3. Efeito matriz

Pesquisas que envolvem amostras complexas como as plantas medicinais, necessitam da avaliação do efeito matriz durante o processo de validação analítica. De acordo com a RDC 166/2017, este parâmetro deve ser

realizado a partir da comparação das inclinações das curvas de calibração obtidas no solvente e no extrato da matriz (*Monteverdia obtusifolia*) para os marcadores em estudo (BRASIL, 2017). A comprovação do paralelismo das retas deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada e a confirmação que as retas são paralelas é indicativa de ausência de interferência dos constituintes da matriz (EMA, 2011; MARSON *et al.*, 2020).

Os percentuais de interferência do efeito matriz para cada marcador estão dispostos na Tabela 61.

Tabela 61. Cálculo de interferência de efeito matriz (%EM) para os marcadores.

Marcador	Coeficiente angular com matriz	Coeficiente angular sem matriz	Interferência
(-)-Epigalocatequina	2826,8	2800,9	0,924%
(+)-Catequina	7445,7	7426,2	0,262%
(-)-Epicatequina	17913	17877	0,201%

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Em análises cromatográficas por CLAE, as substâncias presentes na matriz (extrato vegetal) podem interferir no processo e aumentar a resposta cromatográfica obtida, resultando em uma quantificação inapropriada dos marcadores (RUTKOWSKA; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018). Páleníková *et al.*, (2015), Lee *et al.* (2017) e Acosta-Dacal *et al.* (2020) também observaram aumento de sinal para a maioria dos compostos analisados em seus estudos. De acordo com o Guia de validação de métodos bioanalíticos publicado pela Agência Européia de Medicamentos, valores de interferência de até $\pm 15\%$ são aceitáveis para estudos com medicamentos, considera-se que o efeito matriz não é significativo. Para estudos envolvendo pesticidas, estes valores podem atingir $\pm 20\%$ (TRIPATHY; SAHA; KUMAR, 2017; ACOSTA-DACAL *et al.*, 2020).

A Tabela 62 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (-)-Epigalocatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=3$) e forneceu a

equação da reta ($y = 2826,8x - 634,87$). A curva de calibração está plotada no gráfico 57. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,019) $< F_{\text{crítico}}$ (2,194). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,963) para o teste de paralelismo, foi possível observar que valor-P $> 0,05$, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t apresentou valor t (0,007) $< t_{\text{tabelado}}$ (1,859) e valor-P (0,994) $> 0,05$, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

A Tabela 63 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (+)-Catequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=3$) e forneceu a equação da reta ($y = y = 7445,7x + 2828$). A curva de calibração está plotada no gráfico 58. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,005) $< F_{\text{crítico}}$ (2,194). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,989) para o teste de paralelismo, foi possível observar que valor-P $> 0,05$, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t apresentou valor t (0,002) $< t_{\text{tabelado}}$ (2,306) e valor-P (0,999) $> 0,05$, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

A Tabela 64 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (-)-Epicatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9997 ($n=3$) e forneceu a equação da reta ($y = 17913x - 7901,7$). A curva de calibração está plotada no gráfico 59. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,004) $< F_{\text{crítico}}$ (2,465). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,993) para o teste de paralelismo, foi possível observar que valor-P $> 0,05$, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t

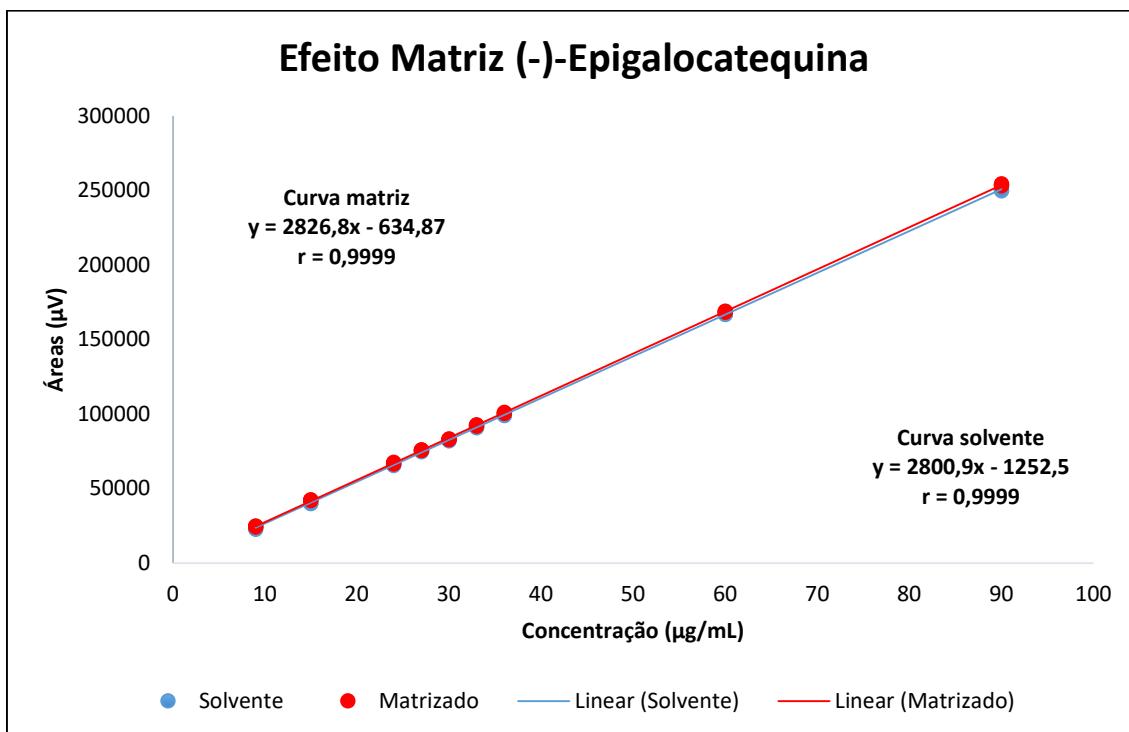
apresentou valor t ($0,05$) $<$ $t_{tabelado}$ ($2,446$) e valor- P ($0,960$) $>$ $0,05$, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

Ao analisar as curvas visualmente, é possível verificar que não houve efeito matriz, uma vez que as construídas com solvente possuem inclinação semelhante às curvas com adição de padrão na matriz (extrato de *M. obtusifolia*). A tabela 65 resume os dados de análise estatística para o efeito matriz dos marcadores analisados.

Tabela 62. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epigalocatequina ($n=3$).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
9 µg/mL	1	25012			
	2	24456	24763,33	8,98 µg/mL	1,14
	3	24822			
15 µg/mL	1	42333			
	2	42201	42396	15,22 µg/mL	0,55
	3	42654			
24 µg/mL	1	67889			
	2	66931	67188,33	23,99 µg/mL	0,91
	3	66745			
27 µg/mL	1	76121			
	2	76086	76024	27,12 µg/mL	0,18
	3	75865			
30 µg/mL	1	83169			
	2	83513	83343,33	29,71 µg/mL	0,21
	3	83348			
33 µg/mL	1	92685			
	2	92122	92578	32,97 µg/mL	0,45
	3	92927			
36 µg/mL	1	101432			
	2	100852	100993,67	35,95 µg/mL	0,38
	3	100697			
60 µg/mL	1	168555			
	2	169003	168894	59,97 µg/mL	0,18
	3	169124			
90 µg/mL	1	253415			
	2	253895	253992	90,08 µg/mL	0,25
	3	254666			

Gráfico 57. Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (9 – 90 µg/mL) para o marcador (-)-Epigallocatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

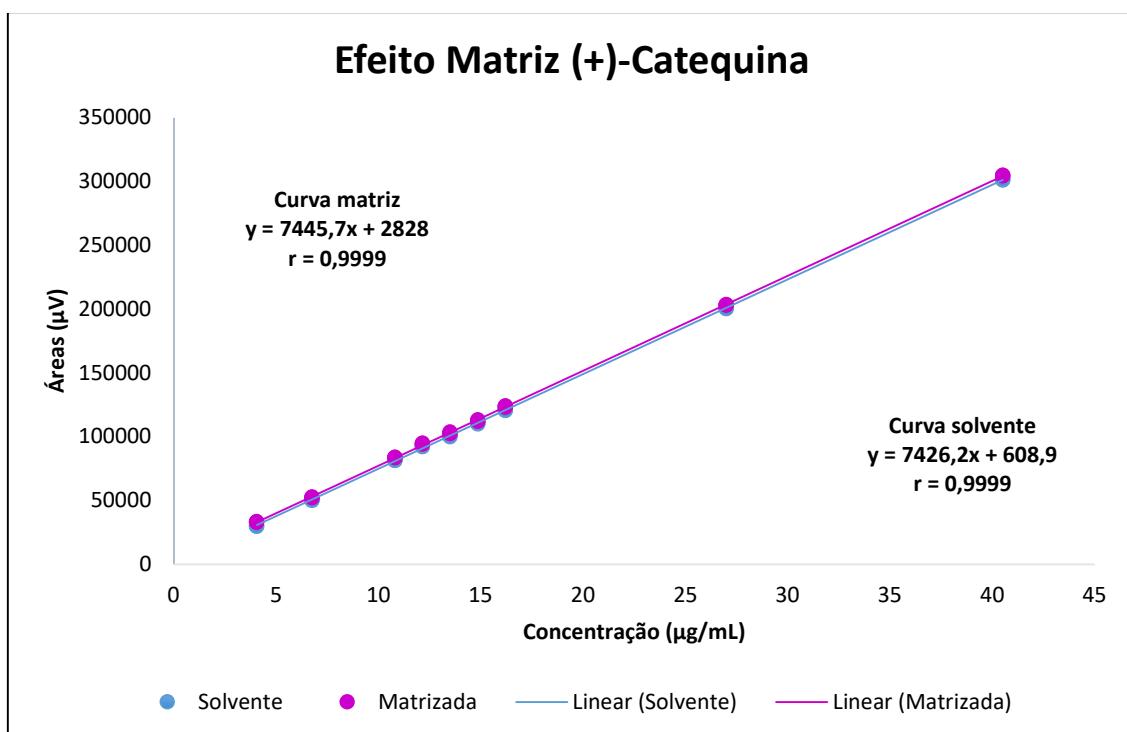
Tabela 63. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (+)-Catequina (n=3).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
4,05 µg/mL	1	33123	33140,67	4,07 µg/mL	0,75
	2	32902			
	3	33397			
6,75 µg/mL	1	52385	52429,33	6,66 µg/mL	0,44
	2	52224			
	3	52679			
10,8 µg/mL	1	83898	83756	10,87 µg/mL	0,15
	2	83653			
	3	83717			
12,15 µg/mL	1	94764	94605,33	12,33 µg/mL	0,51
	2	94989			
	3	94063			
13,5 µg/mL	1	102543	102933	13,44 µg/mL	0,71
	2	102485			
	3	103771			
14,85 µg/mL	1	112346	112520	14,73 µg/mL	0,55

16,2 µg/mL	2	112011	123643,3	16,23 µg/mL	0,43
	3	113203			
	1	123032			
27,0 µg/mL	2	123899			
	3	123999			
	1	203412			
40,5 µg/mL	2	202999	203326,3	26,93 µg/mL	0,14
	3	203568			
	1	304701			
	2	304452	304677,7	40,54 µg/mL	0,07
	3	304880			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 58. Regressão linear da curva de calibração (4,05 – 40,5 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.

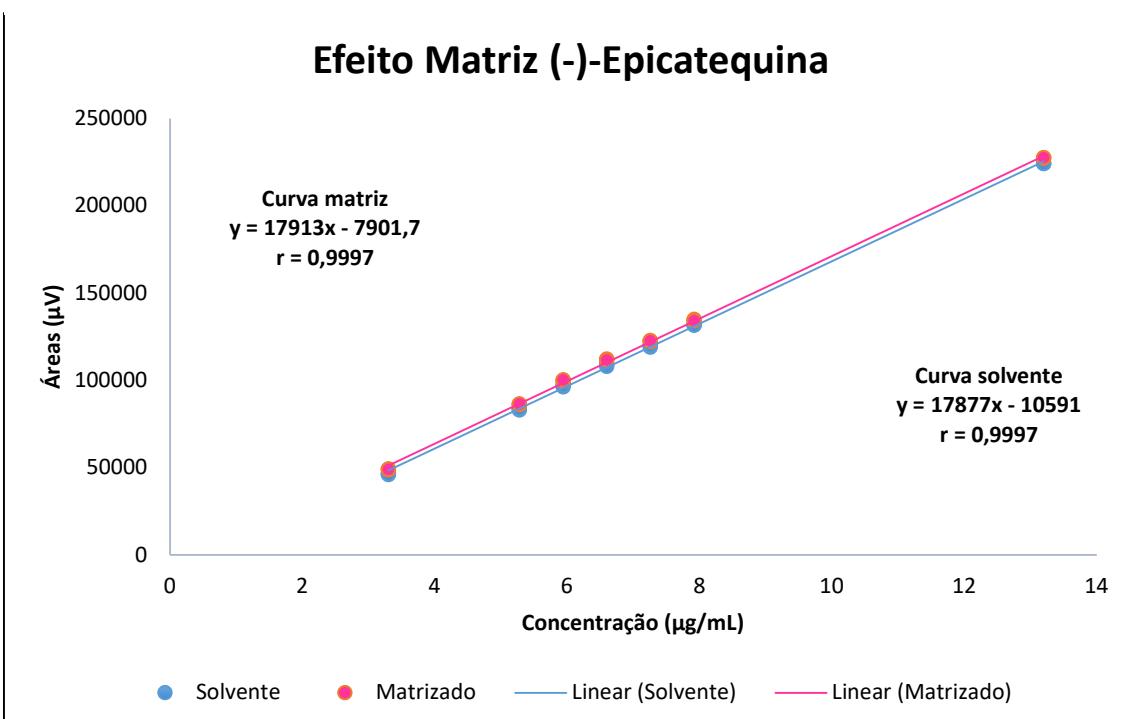


Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 64. Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epicatequina (n=3).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
3,30 µg/mL	1	49338			
	2	48752	49029,66	3,18 µg/mL	0,60
	3	48999			
5,28 µg/mL	1	86101			
	2	86221	86253,66	5,26 µg/mL	0,20
	3	86439			
5,94 µg/mL	1	99502			
	2	100015	99931	6,02 µg/mL	0,39
	3	100276			
6,60 µg/mL	1	111813			
	2	112107	111839,66	6,68 µg/mL	0,23
	3	111599			
7,26 µg/mL	1	122789			
	2	122108	122476,66	7,28 µg/mL	0,28
	3	122533			
7,92 µg/mL	1	134345			
	2	134878	134467,33	7,95 µg/mL	0,27
	3	134179			
13,2 µg/mL	1	227281			
	2	227494	227384,66	13,13 µg/mL	0,05
	3	227379			

Gráfico 59. Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (3,3 – 13,2 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 65. Resumo da análise estatística do parâmetro efeito matriz para os marcadores analisados.

Marcador	F	valor-P (F)	t	valor-P (t)
(-)-Epigalocatequina	1,019	0,963	0,007	0,994
(+)-Catequina	1,005	0,989	0,002	0,999
(-)-Epicatequina	1,004	0,993	0,05	0,960

Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.3.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por extração matemática da curva de calibração de acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RDC Nº 166/2017 – BRASIL, 2017). Os valores estão apresentados na Tabela 66.

Tabela 66. Resumo dos limites de detecção e quantificação para os marcadores analisados.

Marcador	Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)		Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	
	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz
	0,588	0,543	1,962	1,809
(+)-Catequina	0,304	0,310	1,014	1,032
(-)-Epicatequina	0,227	0,225	0,756	0,749

Fonte: ARAÚJO, 2021.

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que o método proposto no presente estudo pode realizar a detecção dos marcadores EPG, CAT e EPI nas concentrações 0,588 $\mu\text{g/mL}$, 0,304 $\mu\text{g/mL}$ e 0,227 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entretanto, para a quantificação são necessárias concentrações como 1,962 $\mu\text{g/mL}$, 1,014 $\mu\text{g/mL}$ e 0,756 $\mu\text{g/mL}$ para os mesmos marcadores.

5.3.5 Precisão

A precisão do método foi determinada em três dias consecutivos de análise por diferentes analistas e mesmo equipamento, obtendo-se os valores de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas). Os teores e seus respectivos valores de DPR estão representados nas Tabelas 67, 68 e 69 para os marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina.

Tabela 67. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (-)-Epigallocatequina.

Dia 1			Dia 2			Dia 3		
Rep	Áreas	Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)		
1	83159	30,19	82444	29,93	83403	30,28		
2	82987	30,13	81786	29,69	82398	29,91		
3	82762	30,04	81542	29,60	82795	30,06		
4	81613	29,63	83103	30,17	83011	30,13		
5	82485	29,94	82505	29,95	83521	30,32		
6	82381	29,91	83509	30,32	82444	29,93		
Média₁		29,97	Média₂		29,94	Média₃		30,14
DP₁		0,200	DP₂		0,272	DP₃		0,166
DPR (%)₁		0,667	DPR (%)₂		0,909	DPR (%)₃		0,550

Média Precisão intermediária **30.01**

DP Precisão intermediária 0,218

DPR (%) Precisão intermediária 0,726

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,088744	2	0,044372	0,921074	0,419472	3,68232
Dentro dos grupos	0,722617	15	0,048174			
Total	0,811361	17				

Teste t	Stat t	t crítico	valor-P
	-0,45438	2,1199	0,6556

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 68. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (+)-Catequina.

Rep	Áreas	Dia 1		Dia 2		Dia 3					
		Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)					
1	100831	13,55	101450	13,63	102003	13,71					
2	101627	13,66	100571	13,52	101528	13,64					
3	101302	13,61	102239	13,74	100993	13,57					
4	100838	13,55	102023	13,71	101389	13,63					
5	102426	13,77	101314	13,62	101555	13,65					
6	101091	13,59	103976	13,97	100107	13,45					
Média₁		13,62	Média₂		13,70	Média₃					
DP₁		0,081	DP₂		0,156	DP₃					
DPR (%)₁		0,598	DPR (%)₂		1,140	DPR (%)₃					
Média Precisão intermediária											
DP Precisão intermediária											
DPR (%) Precisão intermediária											

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,028311	2	0,014156	1,098749	0,35867	3,68232
Dentro dos grupos	0,19325	15	0,012883			
Total	0,221561	17				

Teste t	Stat t	t crítico	valor-P
	-0,5431	2,1199	0,5945

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 69. Dados obtidos no parâmetro Precisão intra e inter-corrida e análise estatística do marcador (-)-Epicatequina.

Rep	Áreas	Dia 1		Dia 2		Dia 3			
		Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)	Áreas	Concentrações (µg/mL)			
1	108344	6,53	109172	6,58	109415	6,59			
2	109254	6,58	109317	6,58	108754	6,55			
3	108525	6,54	108213	6,52	108265	6,52			
4	110807	6,67	110023	6,63	109771	6,61			
5	109451	6,59	109971	6,62	109556	6,60			
6	109592	6,60	108677	6,55	109987	6,63			
Média₁		6,59	Média₂		6,58	Média₃			
DP₁		0,053	DP₂		0,043	DP₃			
DPR (%)₁		0,807	DPR (%)₂		0,651	DPR (%)₃			
							6,58		
							0,043		
							0,651		

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	7,77778E-05	2	3,89E-05	0,019785	0,980435	3,68232
Dentro dos grupos	0,029483333	15	0,001966			
Total	0,029561111	17				

Teste t	Stat t	t crítico	valor-P
	0,1552	2,1199	0,8786

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O parâmetro precisão intra-corrida foi realizado com seis réplicas na concentração 100% dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, e apresentou os desvios padrões relativos (DPR) de 0,667, 0,598 e 0,807, respectivamente, para os marcadores na 1^a execução. 0,909, 1,140 e 0,651 para a 2^a execução e 0,550, 0,644 e 0,600 para a 3^a execução, atendendo às exigências normativas que recomendam DPR < 5,0% (BRASIL, 2003). As variações dos DPRs não foram significativas o que demonstra que o método é preciso e admite variação de analistas.

Os valores de desvios padrões relativos obtidos para a precisão inter-corrida (n=18) foram de 0,726 para a (-)-Epigalocatequina, 0,837 para a (+)-Catequina e 0,651 para a (-)-Epicatequina, os quais também estão abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira vigente para validação de métodos analíticos, cujo DPR deve ser inferior a 5,0% (BRASIL, 2003). Dessa forma, o método proposto para o doseamento dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral é preciso, pois apresenta desvios padrões relativos inferiores aos especificados como limite na legislação vigente.

Os dados obtidos na precisão foram submetidos à avaliação de variância por ANOVA *one way*, e foi possível observar que não há diferenças estatísticas significativas, com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas nos três dias. $F\ 0,921 < F_{crítico}\ 3,682$ para Epigalocatequina, $F\ 1,098 < F_{crítico}\ 3,682$ para Catequina e $F\ 0,019 < F_{crítico}\ 3,682$ para Epicatequina. O valor- $P>0,05$ obtido confirma a validade do ensaio 0,419, 0,359 e 0,980, respectivamente para os marcadores analisados.

Em seguida, foram submetidos à avaliação por teste *t* de Student, onde foi possível observar que o $t_{calculado}$ ($t=-0,454$) < $t_{crítico}$ (2,119) para o marcador (-)-Epigalocatequina, $t_{calculado}$ ($t=-0,543$) < $t_{crítico}$ (2,119) para o marcador (+)-Catequina e $t_{calculado}$ ($t=0,155$) < $t_{crítico}$ (2,119) para o marcador (-)-Epicatequina, com validade confirmada pelo valor- $P>0,05$ de 0,656, 0,595 e 0,879, respectivamente, demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas pelos diferentes analistas.

5.3.6 Exatidão

A exatidão representa a proximidade entre o valor da concentração analisada de uma amostra conhecida e o valor de concentração calculado da curva de calibração. O estudo é conduzido em todas as medidas. Este conjunto de dados é transformado em um conjunto de recuperações, que corresponde a concentração calculada dividida pela concentração real e multiplicada por 100. Um intervalo de confiança está associado à recuperação média desse conjunto (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

O método será considerado exato, caso a recuperação teórica de 100% estiver inserida no intervalo de confiança de 95 a 105% para os três níveis de concentração testados. A metodologia de recuperação adotada para este estudo foi a de adição de padrão (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

Os resultados obtidos no parâmetro de exatidão demonstraram concordância entre os teores esperados e os encontrados. Os valores médios para os três níveis avaliados foram de $(100,21 \% \pm 0,384)$ para a (-)-Epigalocatequina, $(100,27 \% \pm 0,435)$ para a (+)-Catequina e $(101,06 \% \pm 0,354)$ para a (-)-Epicatequina, comprovando que o método é exato para o doseamento dos marcadores no extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* Mart., visto que os resultados encontram-se em conformidade com a legislação vigente (RE nº 899/2003/ RDC 166/2017) para validação de métodos analíticos.

Os dados obtidos na exatidão foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, onde foi possível observar que o valor-p calculado ($p=0,081$) $> 0,05$ para o marcador (-)-Epigalocatequina, valor-p calculado ($p=0,597$) $> 0,05$ para o marcador (+)-Catequina e o valor-p calculado ($p=0,197$) $> 0,05$ para o marcador (-)-Epicatequina demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas nos diferentes níveis avaliados. Os valores detalhados estão dispostos nas tabelas a seguir. A Tabela 70 exibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigalocatequina.

Tabela 70. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epigalocatequina.

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)		
80%	1	66147	80,04	100,05			
	2	65891	79,73	99,67	99,96		
	3	66223	80,13	100,17			
				DP	0,263		
				DPR (%)	0,263		
<hr/>							
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)		
100%	1	82604	99,96	99,96			
	2	83020	100,46	100,46	100,02		
	3	82346	99,64	99,64			
				DP	0,412		
				DPR (%)	0,411		
<hr/>							
Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)		
120%	1	100162	121,20	101,00			
	2	99721	120,67	100,56	100,65		
	3	99568	120,48	100,40			
				DP	0,311		
				DPR (%)	0,309		
<hr/>							
Área do padrão do marcador (-)-Epigalocatequina					82640		
Recuperação média para os 3 níveis (%)					100,21 ± 0,384		

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A Tabela 71 exibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina.

Tabela 71. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (+)-Catequina.

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	80714	80,35	100,44	
	2	82006	81,64	102,05	101,23
	3	81325	80,96	101,20	
			DP		0,804
			DPR (%)		0,795

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	100148	99,70	99,70	
	2	101925	101,47	101,47	100,65
	3	101236	100,78	100,78	
			DP		0,892
			DPR (%)		0,886

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	121102	120,56	100,47	
	2	122254	121,71	101,42	101,30
	3	122981	122,43	102,03	
			DP		0,786
			DPR (%)		0,776

Área do padrão do marcador (+)-Catequina **100450**

Recuperação média para os 3 níveis (%) **101,06 ± 0,354**

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A Tabela 72 exibe os dados referentes ao parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina.

Tabela 72. Dados do parâmetro Exatidão para o marcador (-)-Epicatequina.

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	88106	80,41	100,52	
	2	87491	79,85	99,81	100,55
	3	88803	81,05	101,31	
		DP		0,749	
		DPR (%)		0,745	

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	108901	99,39	99,39	
	2	109555	99,99	99,99	99,77
	3	109473	99,91	99,91	
		DP		0,325	
		DPR (%)		0,326	

Nível	Réplica	Áreas	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	131681	120,18	100,15	
	2	132612	121,03	100,86	100,49
	3	132088	120,55	100,46	
		DP		0,355	
		DPR (%)		0,353	

Área do padrão do marcador (+)-Epicatequina **109567**

Recuperação média para os 3 níveis (%) **100,27 ± 0,435**

Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.3.7 System suitability

Os resultados de avaliação da adequabilidade do sistema para análise dos extratos etanólicos brutos (EEB) de *M. obtusifolia* estão apresentados na Tabela 73.

Tabela 73. Parâmetros de System suitability.

Parâmetro	(-)-Epigallocatequina	(+)-Catequina	(-)-Epicatequina
Fator de cauda/assimetria (T)	1,1	1,05	1,3
Resolução (R_s)	2,43	2,28	2,67
Fator de capacidade (k')	8,1	9,02	14,3
Número de pratos teóricos (N)	7803	9978	10706

Parâmetros de referência: $T \leq 2,0$; $R_s > 2,0$; $k' > 2$; $N > 2000$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; FDA, 2000).

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Diversos fatores afetam os parâmetros de adequabilidade do sistema e, como consequência, podem alterar a resolução do sistema e os resultados fornecidos pelo mesmo. A eficiência da coluna é determinada pelo tamanho médio e pela forma das partículas da fase estacionária (se são esféricas ou irregulares), além da uniformidade da mesma, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, massa de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra coluna como conexões, tubulações, célula, injetor, entre outros (USP, 2003; EPSHTEIN, 2004; CHOUDHARY, 2008).

Ainda de acordo com os autores, o fator de capacidade, por sua vez, pode ser afetado pela polaridade da fase móvel e da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela porcentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna.

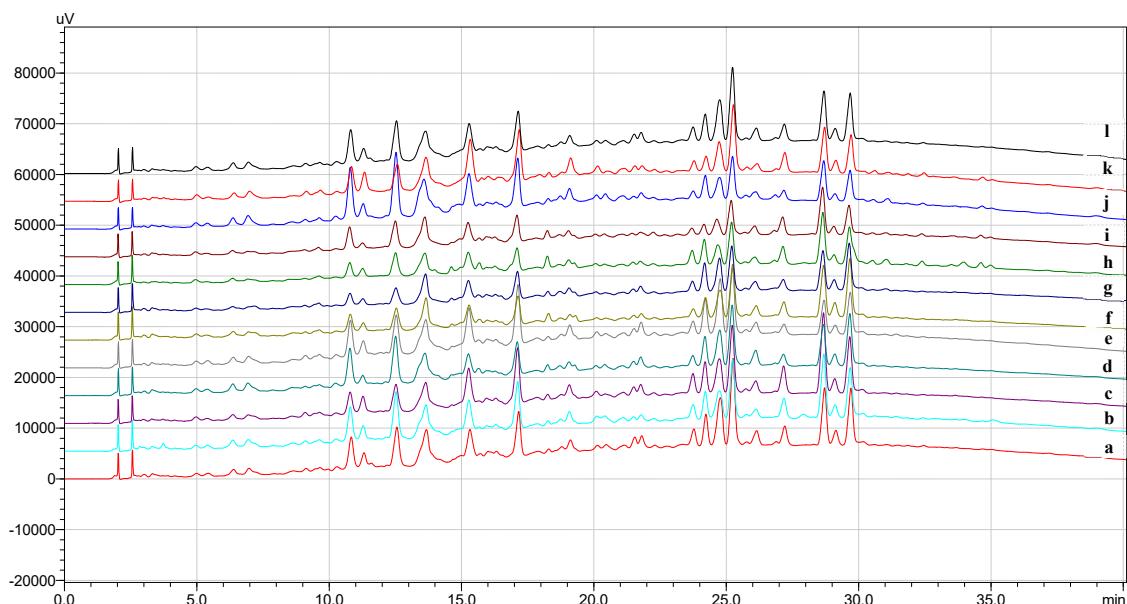
Ao avaliar os resultados obtidos para a análise de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia* utilizando a instrumentação e metodologia proposta no presente estudo, foi possível observar que todos os parâmetros de adequabilidade do sistema estão em acordo com os valores de referência ($T \leq 2,0$; $R_s > 2,0$; $k' > 2$; $N > 2000$), demonstrando ser apropriado para a realização das respectivas análises.

5.4 Estudo de sazonalidade de *Monteverdia obtusifolia* Mart

Os resultados obtidos através do método desenvolvido e validado para a quantificação dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina nos extratos etanólicos secos (EEB) e extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* (Mart.) Biral estão apresentados nas Tabelas 74 e 75 e foram dispostos nos gráficos 60 a 65, respectivamente. Os dados comparativos entre os tratamentos de cada marcador estão dispostos nos Gráficos 66, 67 e 68. Os Gráficos 69 e 70 apresentam a comparação entre os três marcadores de acordo com o tipo de extrato preparado. As sobreposições dos cromatogramas obtidos para os (EEB) e os (EEBq) de janeiro a dezembro de 2017 estão dispostas nas Figuras 33 e 34.

As figuras 35 a 46 apresentam as sobreposições dos cromatogramas dos EEB e EEBq, comparando-os mensalmente.

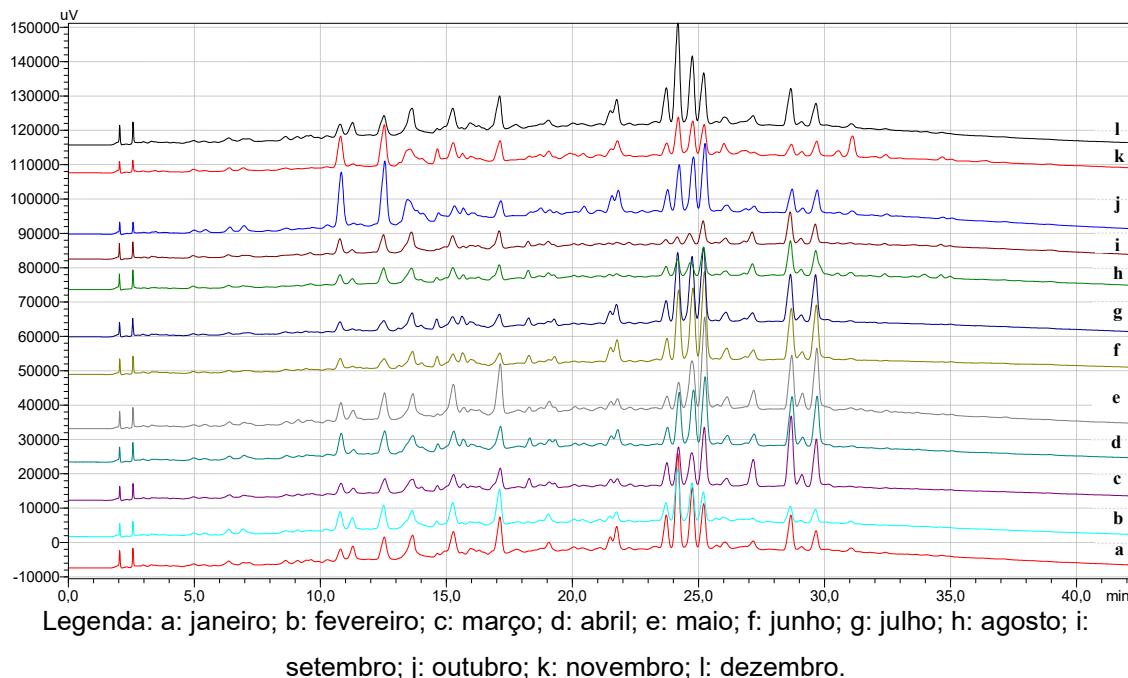
Figura 33. Cromatogramas sobrepostos dos (EEB) de janeiro a dezembro de 2017, na concentração de 100%.



Legenda: a: janeiro; b: fevereiro; c: março; d: abril; e: maio; f: junho; g: julho; h: agosto; i: setembro; j: outubro; k: novembro; l: dezembro.

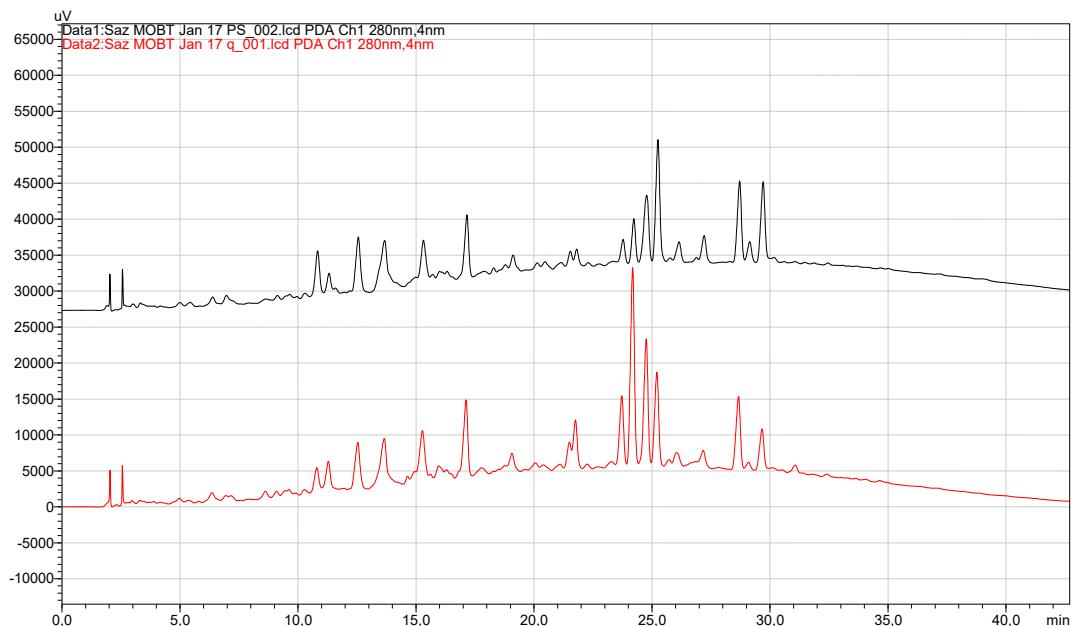
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 34. Cromatogramas sobrepostos dos (EEBq) de janeiro a dezembro de 2017, na concentração de 100%.



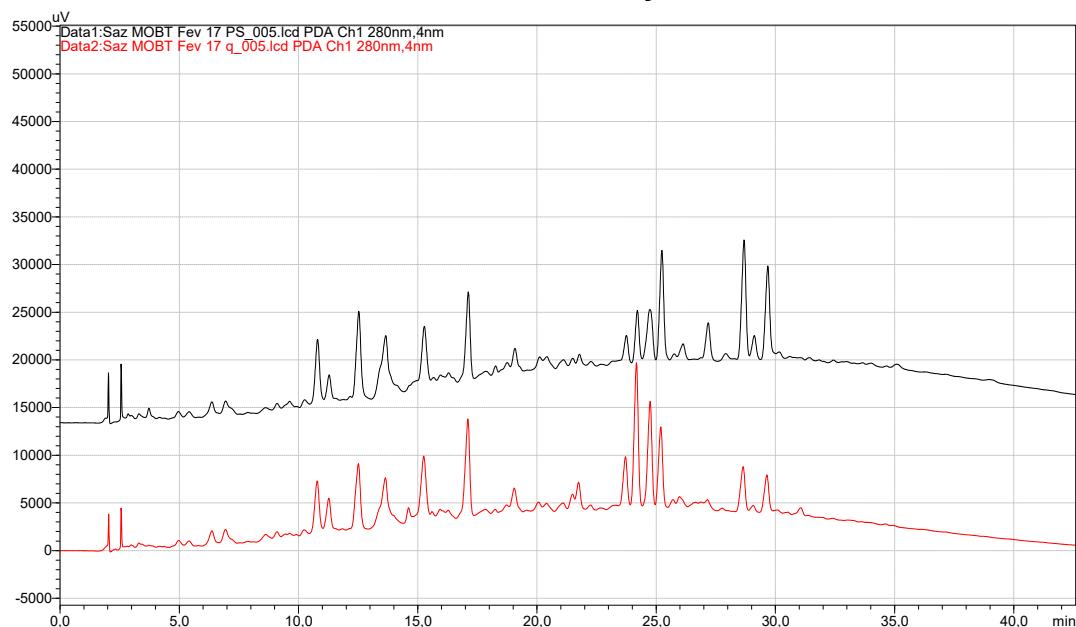
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 35. Cromatogramas sobrepostos do (EEB —) x (EEBq —) obtidos no mês de janeiro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



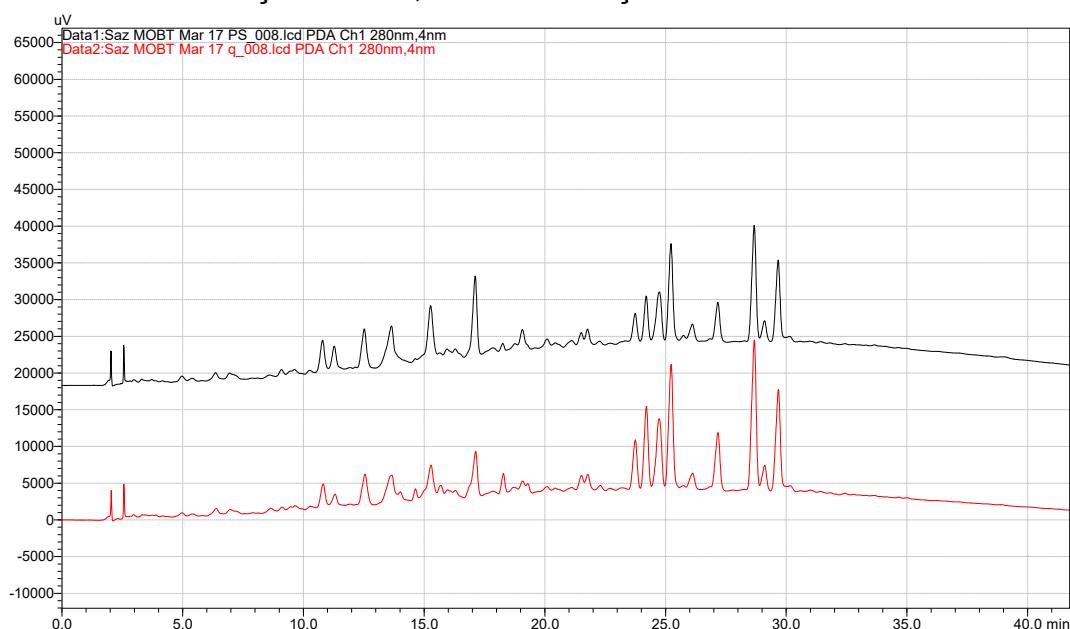
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 36. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de fevereiro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



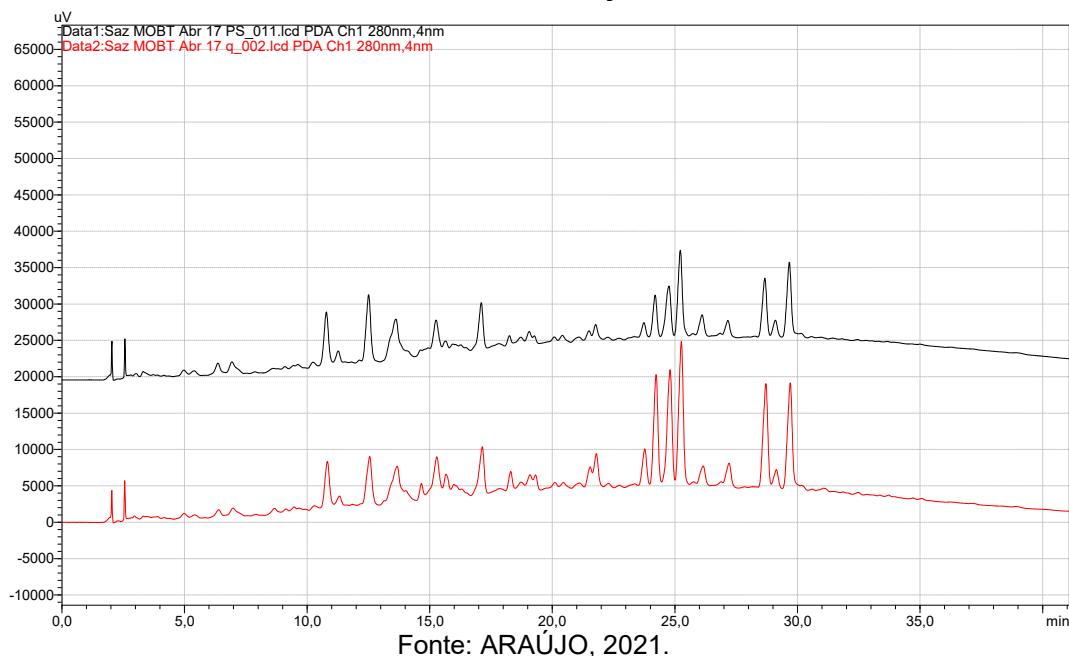
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 37. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de março de 2017, na concentração de 100% da amostra.



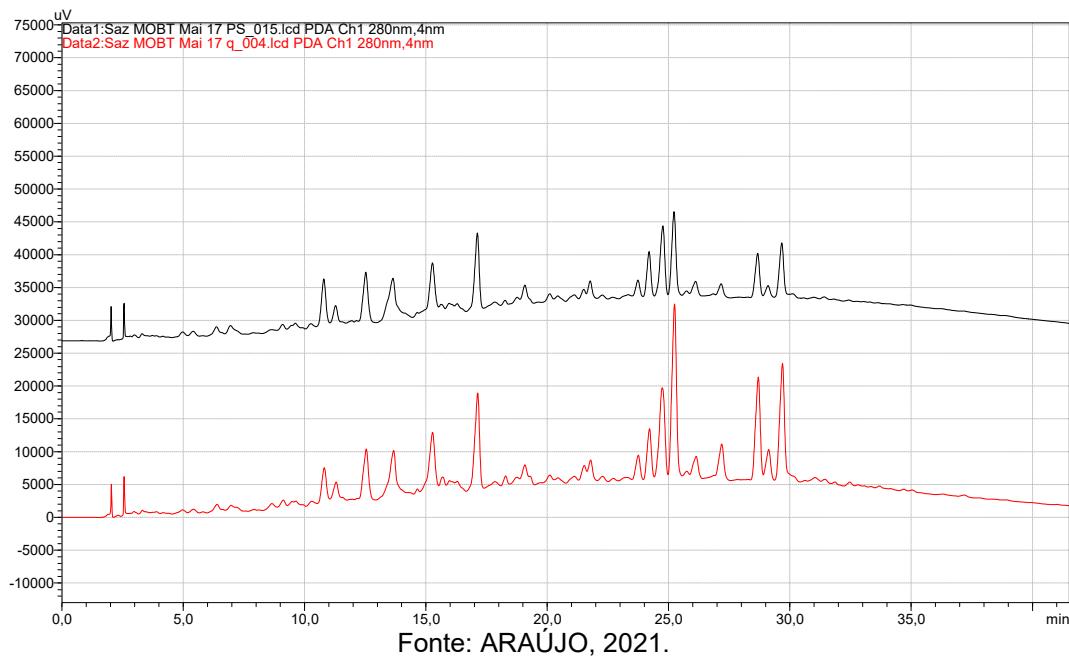
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 38. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de abril de 2017, na concentração de 100% da amostra.



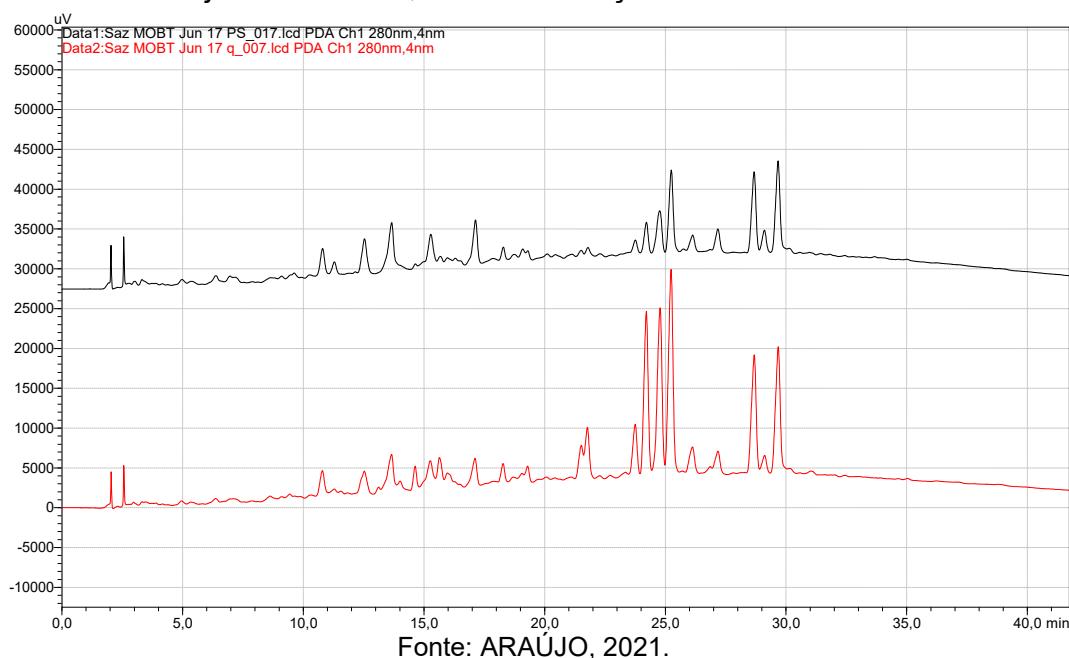
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 39. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de maio de 2017, na concentração de 100% da amostra.



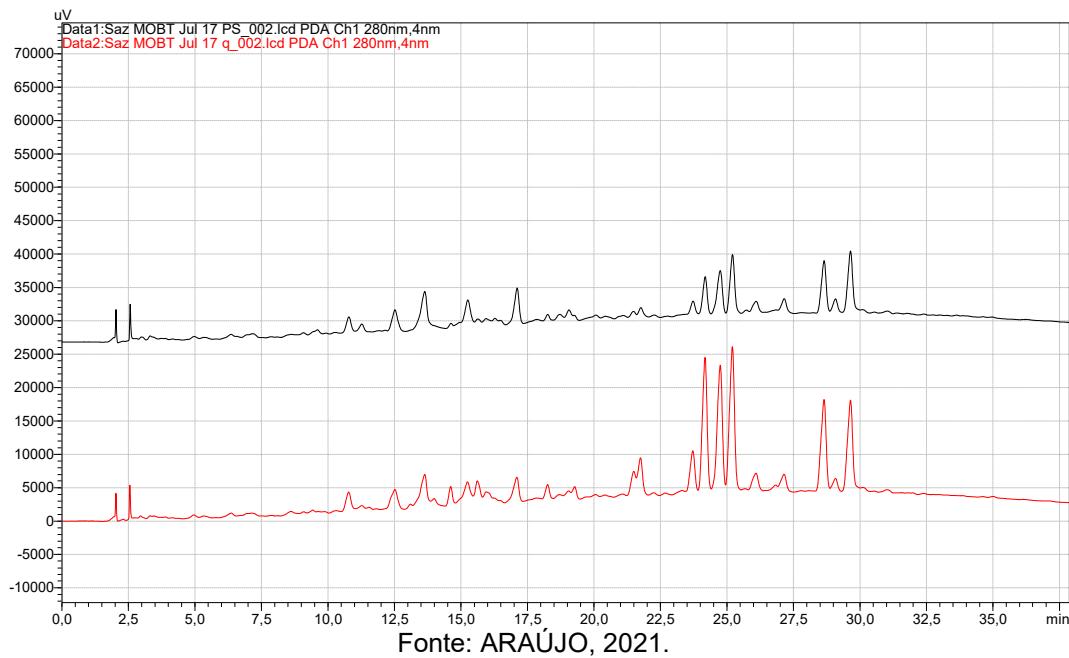
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 40. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de junho de 2017, na concentração de 100% da amostra.



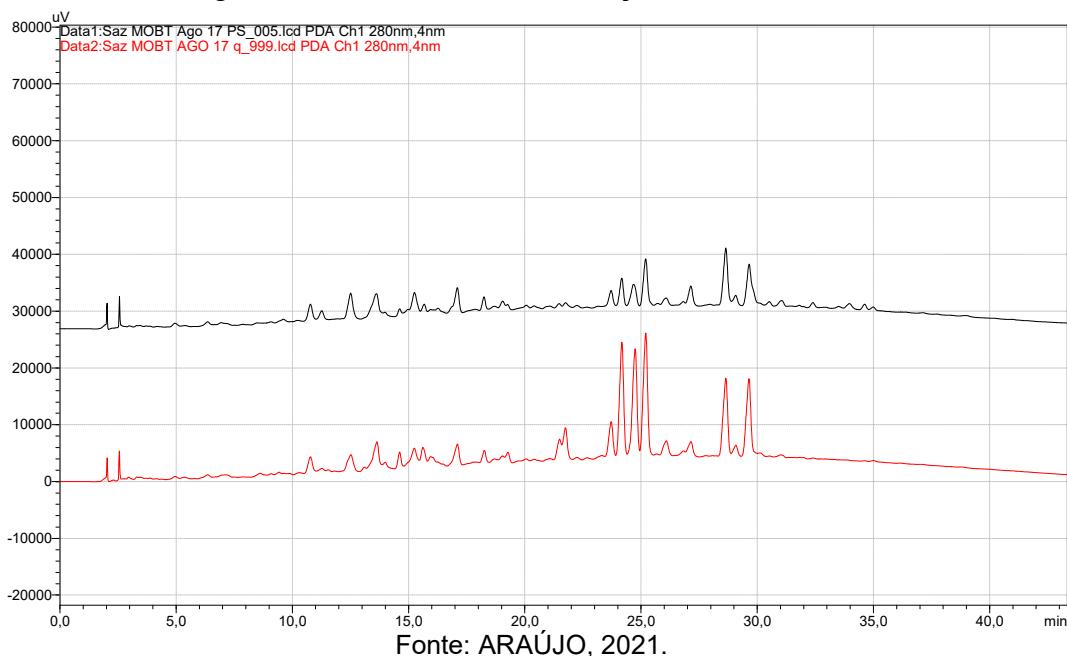
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 41. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de julho de 2017, na concentração de 100% da amostra.



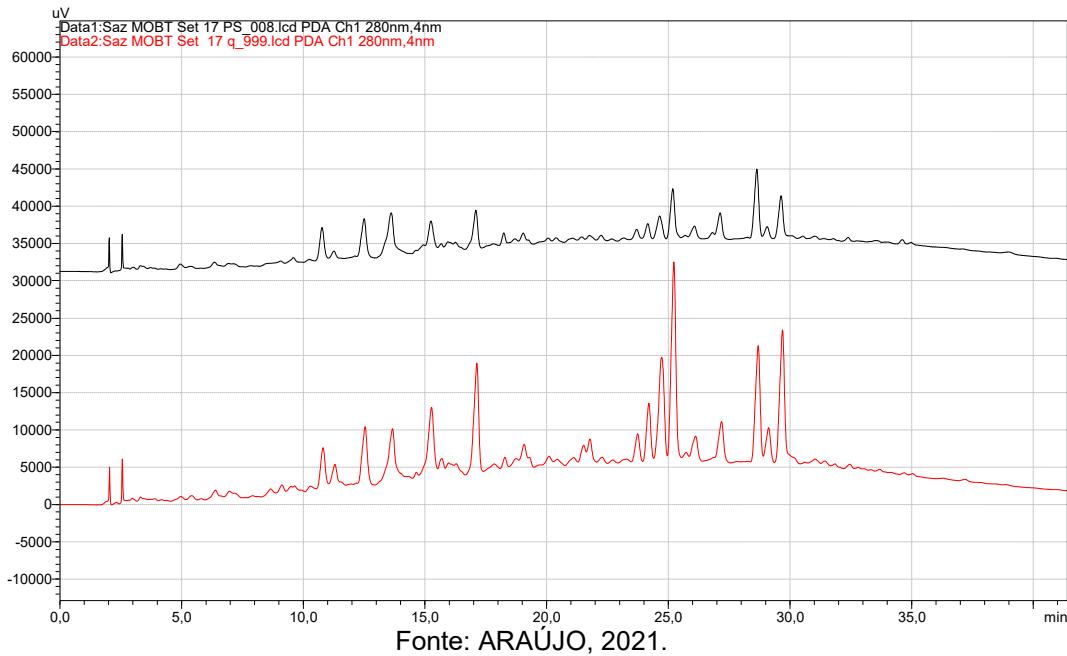
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 42. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de agosto de 2017, na concentração de 100% da amostra.



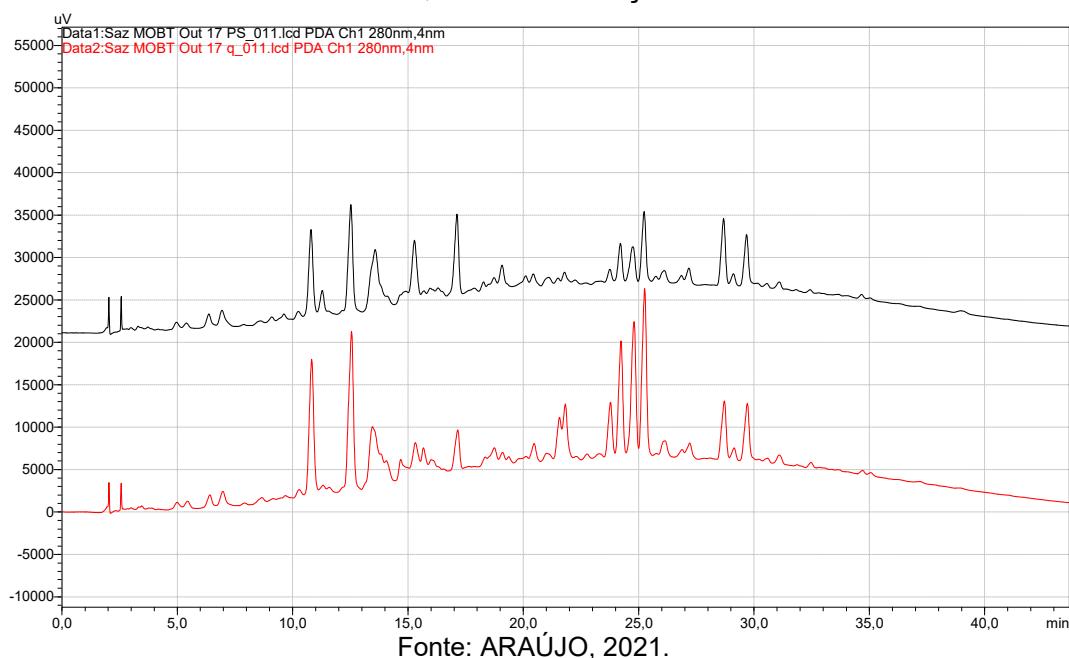
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 43. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de setembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



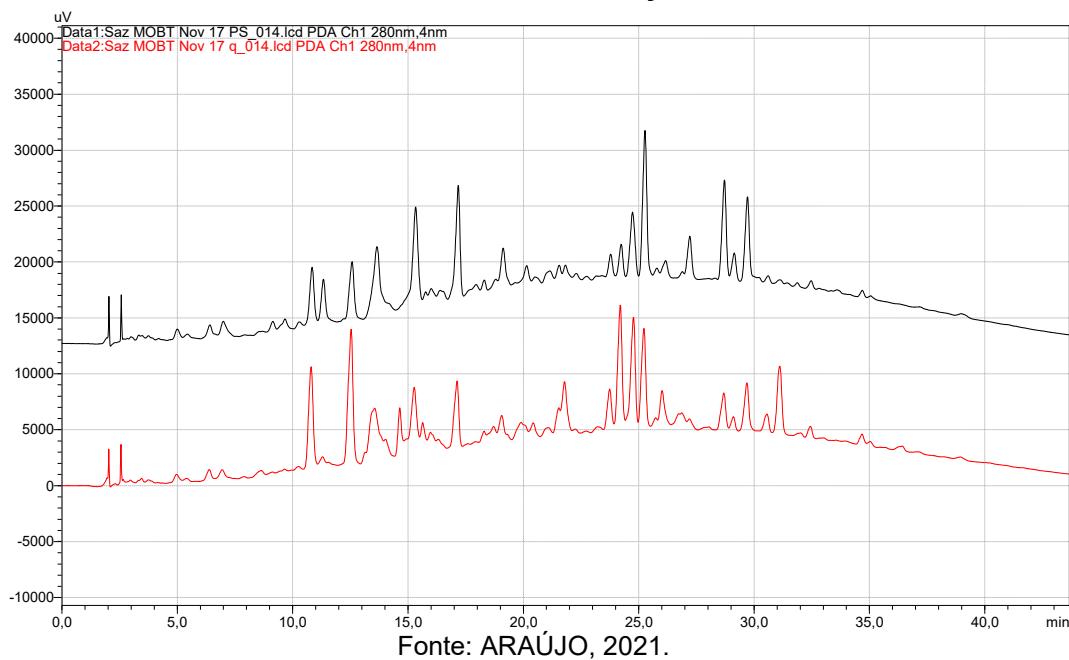
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 44. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de outubro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



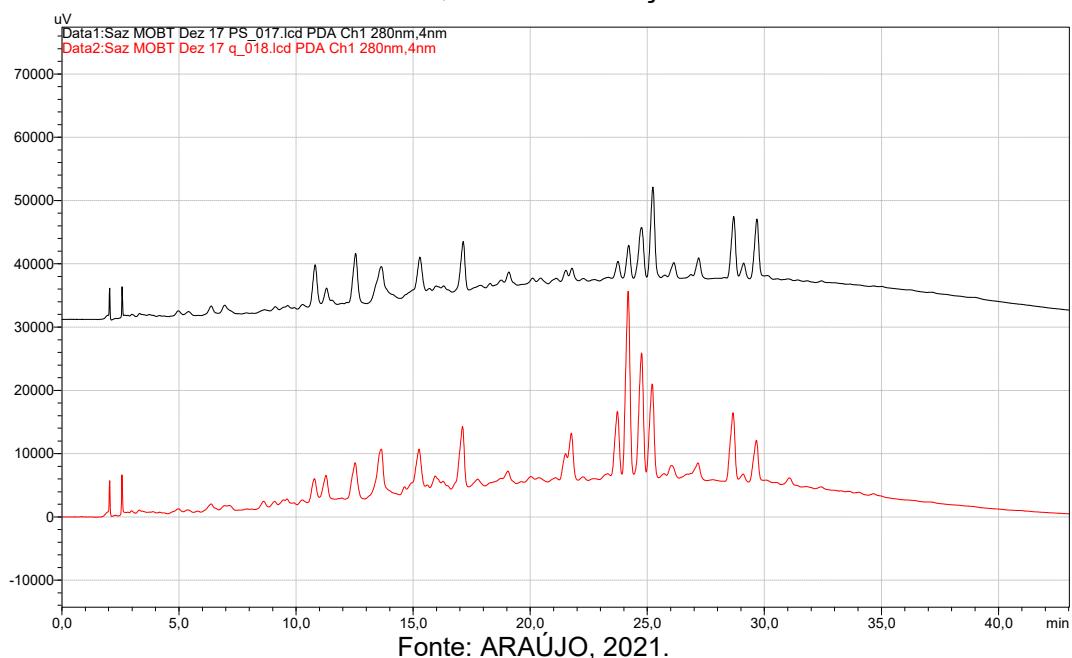
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 45. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de novembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 46. Cromatogramas sobrepostos do (EEB—) x (EEBq —) obtidos no mês de dezembro de 2017, na concentração de 100% da amostra.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 74. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* Mart (EEB) obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

	Epigalocatequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPG)	Desvio Padrão (DP) (EPG)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Catequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (CAT)	Desvio Padrão (DP) (CAT)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Epicatequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPI)	Desvio Padrão (DP) (EPI)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	25,46				13,55				6,66			
	26,97	26,41	0,83	3,15	13,66	13,61	0,06	0,40	6,53	6,59	0,07	1,05
	26,81				13,61				6,58			
Fevereiro	28,34				15,65				6,89			
	28,69	28,90	0,70	2,41	15,54	15,57	0,07	0,44	6,86	6,91	0,05	0,76
	29,68				15,52				6,96			
Março	17,88				9,34				7,36			
	17,83	18,03	0,30	1,65	9,73	9,56	0,20	2,11	7,49	7,50	0,15	1,93
	18,37				9,63				7,65			
Abril	31,86				15,87				4,92			
	32,15	31,15	0,29	0,92	16,20	16,02	0,17	1,07	4,81	4,87	0,06	1,22
	32,45				15,98				4,87			
Maio	30,25				13,68				8,84			
	30,80	13,51	0,17	1,24	13,35	13,51	0,17	1,24	8,77	8,78	0,06	0,70
	30,42				13,50				8,72			
Junho	13,69				8,35				4,28			
	14,77	14,36	0,58	4,06	8,29	8,32	0,03	0,34	4,30	4,32	0,05	1,06
	14,63				8,31				4,37			
Julho	9,40	9,79	0,41	4,22	6,09	6,23	0,12	1,87	3,97	4,10	0,11	2,73

	9,74				6,28				4,12			
	10,22				6,30				4,19			
	12,36				8,58				3,59			
Agosto	12,29	12,43	0,18	1,46	8,83	8,70	0,12	1,43	3,77	3,70	0,10	2,65
	12,64				8,68				3,73			
	18,73				9,54				4,09			
Setembro	19,16	19,07	0,31	1,61	9,61	9,59	0,04	0,40	4,20	4,11	0,08	1,95
	19,33				9,60				4,05			
	44,77				22,71				7,19			
Outubro	44,64	44,93	0,39	0,87	22,31	22,38	0,31	1,37	7,09	7,21	0,13	1,77
	45,37				22,11				7,34			
	22,54				13,55				8,00			
Novembro	22,94	22,90	0,34	1,46	13,70	13,63	0,07	0,53	8,04	8,02	0,02	0,25
	23,21				13,63				8,02			
	28,88				14,54				6,08			
Dezembro	28,99	28,79	0,26	0,91	14,51	14,46	0,12	0,80	6,09	6,00	0,14	2,35
	28,49				14,33				5,84			
Média anual	24,02		0,40	1,99	12,62		0,12	1	6,01		0,08	1,54

Fonte: ARAÚJO, 2021.

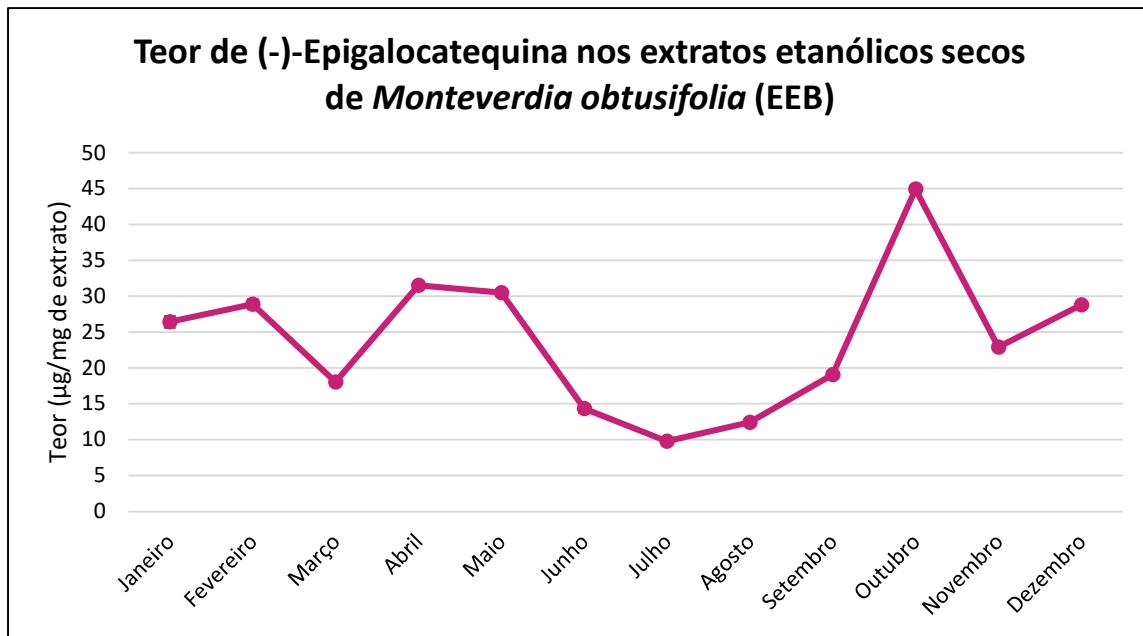
Tabela 75. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* Mart submetidos ao Quenching (EEBq) obtidos a partir das coletas nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.

	Epigalocatequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPG)	Desvio Padrão (DP) (EPG)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Catequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (CAT)	Desvio Padrão (DP) (CAT)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Epicatequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPI)	Desvio Padrão (DP) (EPI)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Janeiro	13,82				12,46				7,11			
	14,41	14,25	0,37	2,60	12,92	12,75	0,26	2,02	7,24	7,14	0,10	1,35
	14,50				12,89				7,06			
Fevereiro	23,90				12,27				7,49			
	24,13	24,10	0,19	0,78	12,39	12,41	0,15	1,21	7,50	7,55	0,09	1,18
	24,28				12,57				7,65			
Março	13,81				8,14				5,56			
	14,00	14,00	0,20	1,41	8,03	8,16	0,14	1,72	5,50	5,54	0,03	0,59
	14,21				8,31				5,56			
Abril	27,36				12,72				5,41			
	28,36	27,92	0,51	1,84	12,96	12,75	0,19	1,53	5,46	5,35	0,14	2,63
	28,05				12,58				5,19			
Maio	22,86				14,74				12,03			
	23,10	23,04	0,16	0,68	14,71	14,75	0,05	0,31	11,96	11,85	0,25	2,10
	23,16				14,80				11,57			
Junho	13,65				6,39				3,00			
	13,54	13,68	0,16	1,17	6,36	6,40	0,06	0,93	3,04	2,96	0,08	2,66
	13,85				6,47				2,87			
Julho	12,30	12,25	0,05	0,39	6,15	6,26	0,09	1,47	3,03	3,07	0,05	1,78

	12,21			6,32				3,04			
	12,24			6,31				3,13			
	14,54			10,20				2,80			
Agosto	14,90	14,87	0,31	2,08	10,36	10,36	0,16	1,55	2,79	2,80	0,02
	15,15			10,52				2,83			
	16,16			10,28				2,84			
Setembro	16,40	16,44	0,29	1,79	10,39	10,41	0,14	1,33	2,82	2,82	0,01
	16,74			10,55				2,81			
	74,29			34,80				3,78			
Outubro	74,59	74,41	0,16	0,22	35,43	34,80	0,62	1,78	3,80	3,75	0,07
	74,34			34,18				3,68			
	42,89			23,04				4,87			
Novembro	43,01	43,02	0,13	0,29	23,25	23,07	0,17	0,75	4,88	4,87	0,01
	43,14			22,91				4,85			
	15,53			12,20				8,11			
Dezembro	15,80	15,77	0,22	1,42	12,27	12,20	0,06	0,53	8,28	8,17	0,10
	15,97			12,14				8,12			
Média anual	24,48		0,23	1,22	13,69		0,17	1,26	5,49		0,08
											1,40

Fonte: ARAÚJO, 2021.

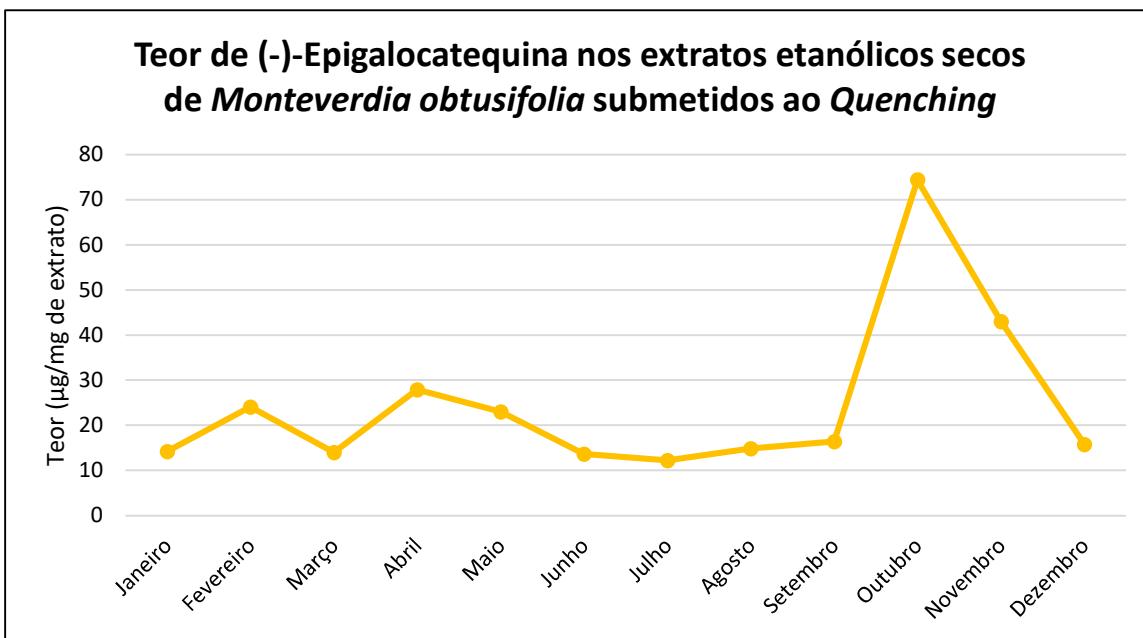
Gráfico 60. Teores do marcador (-)-Epigalocatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

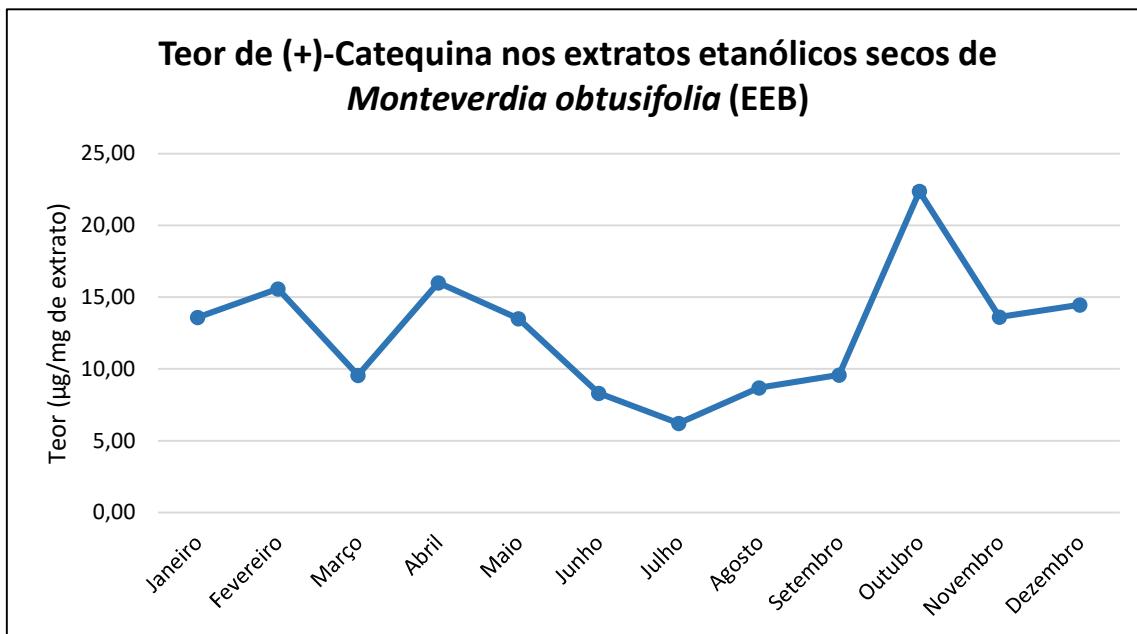
Gráfico 61. Teores do marcador (-)-Epigalocatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

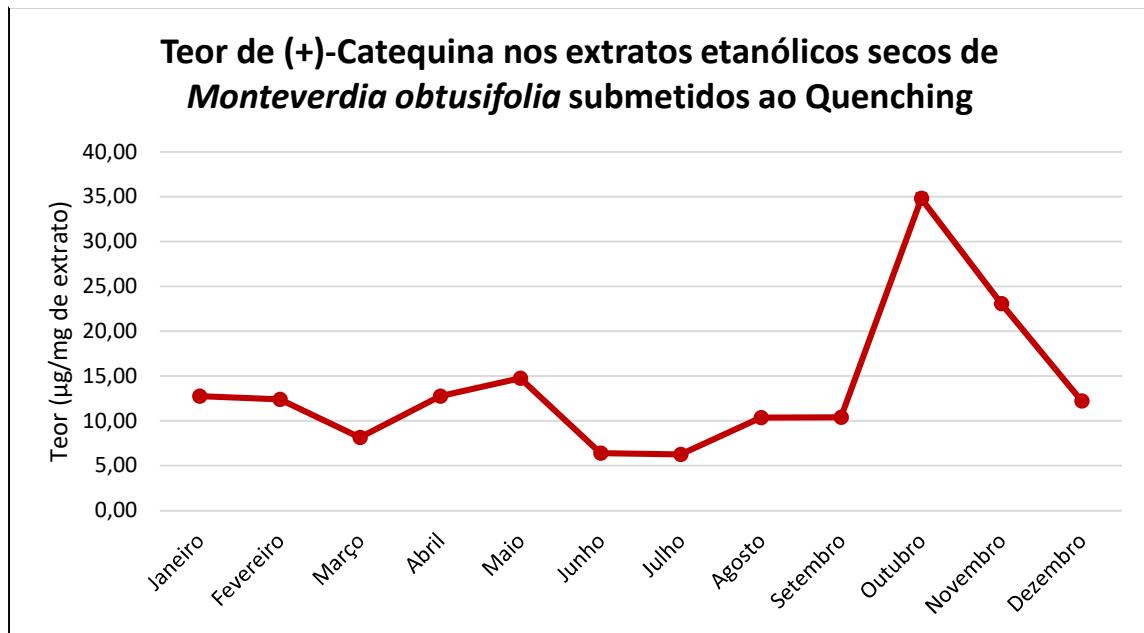
Gráfico 62. Teores do marcador (+)-Catequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

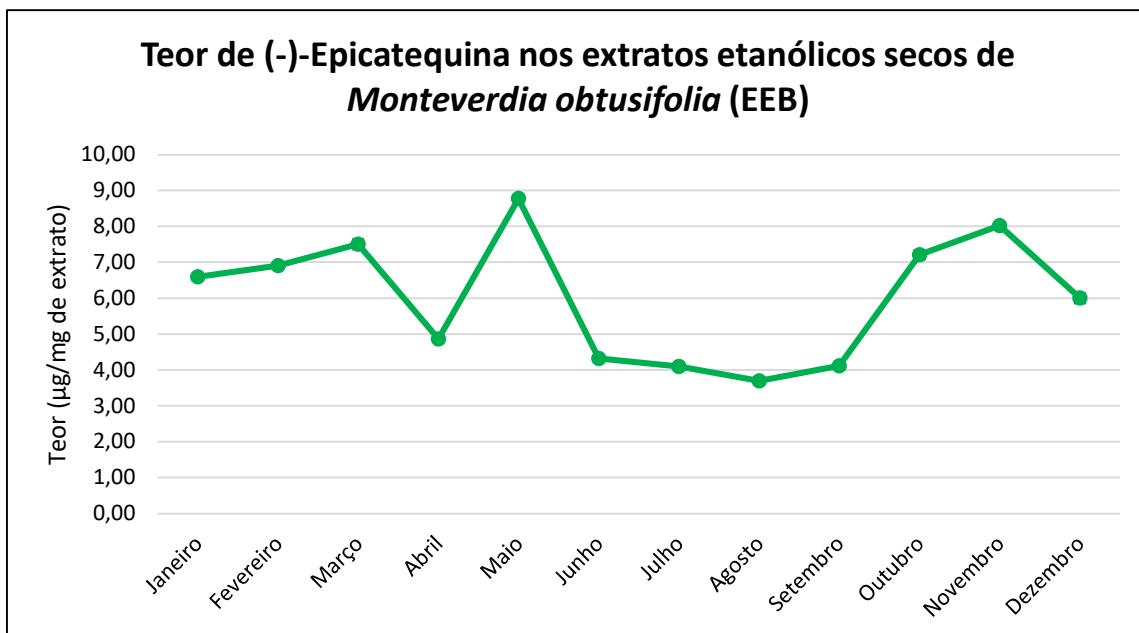
Gráfico 63. Teores do marcador (+)-Catequina (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

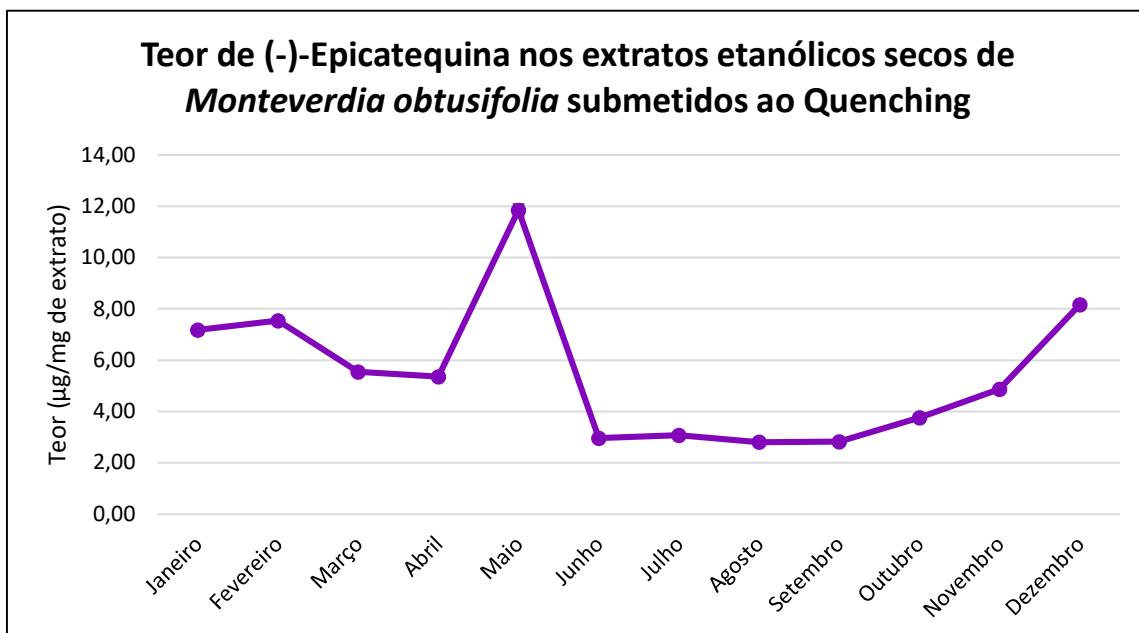
Gráfico 64. Teores do marcador (-)-Epicatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB), de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

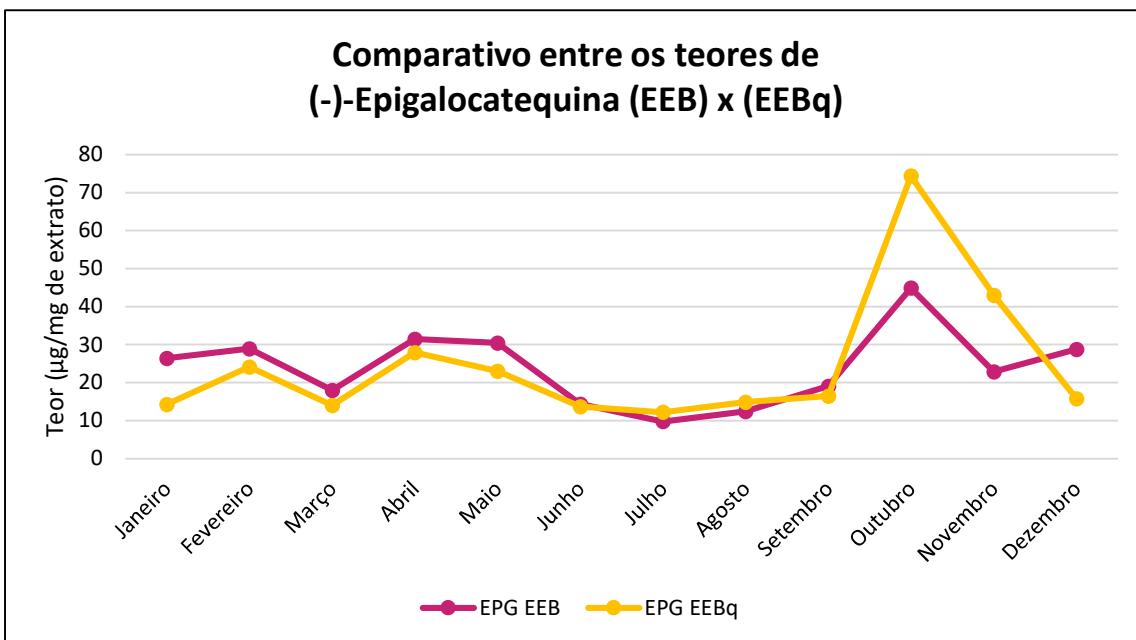
Gráfico 65. Teores do marcador (-)-Epicatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021

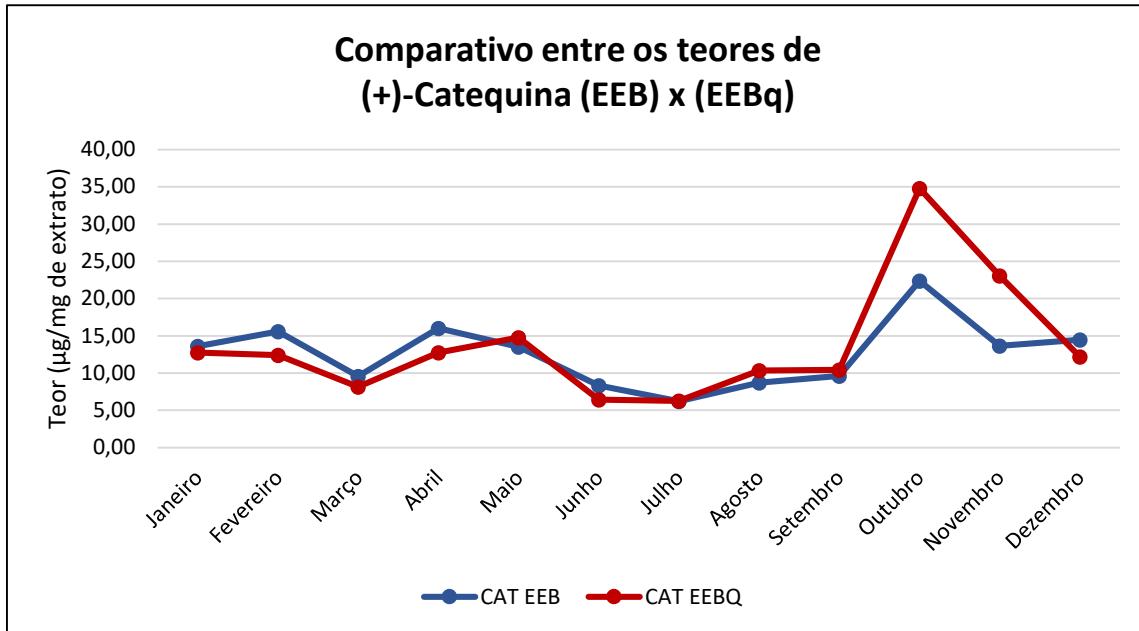
Gráfico 66. Comparativo dos teores do marcador (-)-Epigalocatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

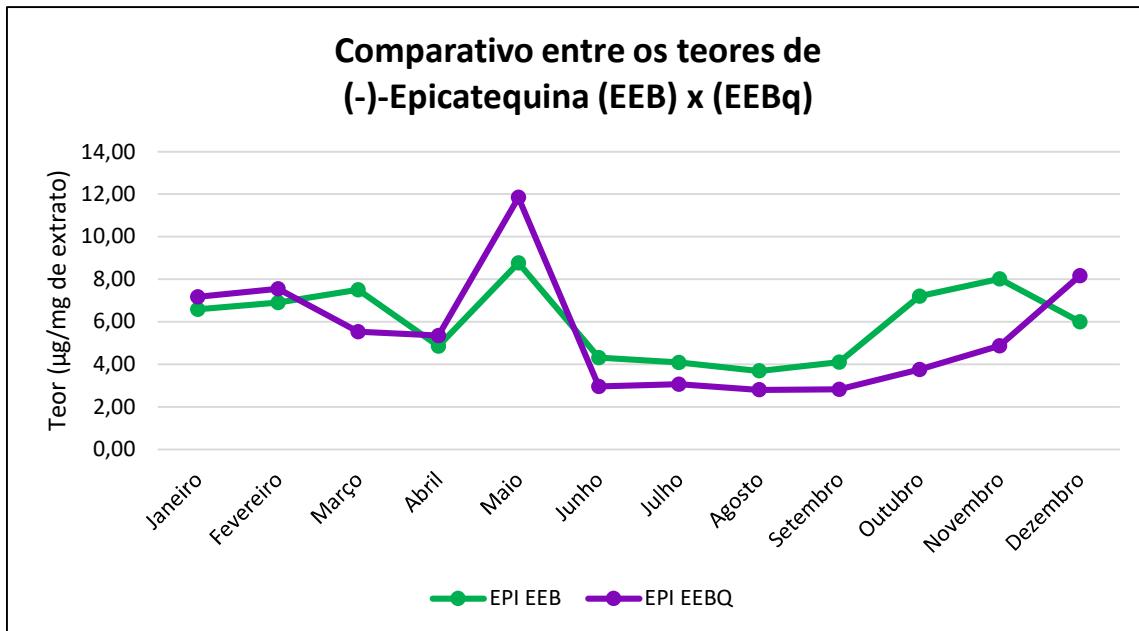
Gráfico 67. Comparativo dos teores do marcador (+)-Catequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021

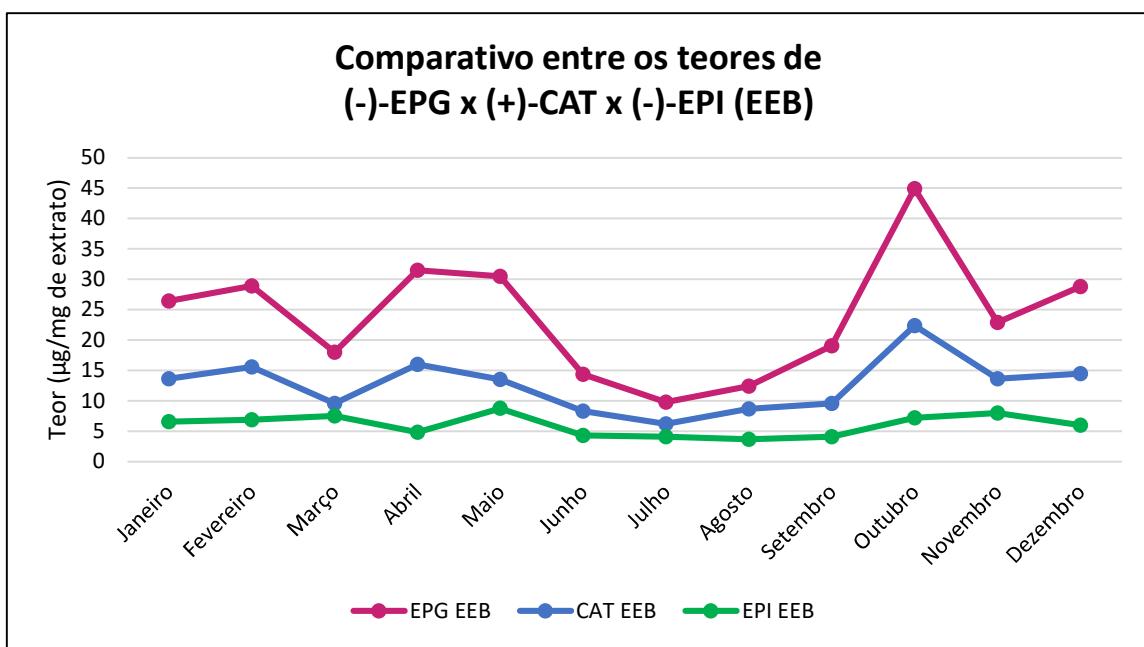
Gráfico 68. Comparativo dos teores do marcador (-)-Epicatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB) e extratos etanólicos secos submetidos ao Quenching (EEBq), de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

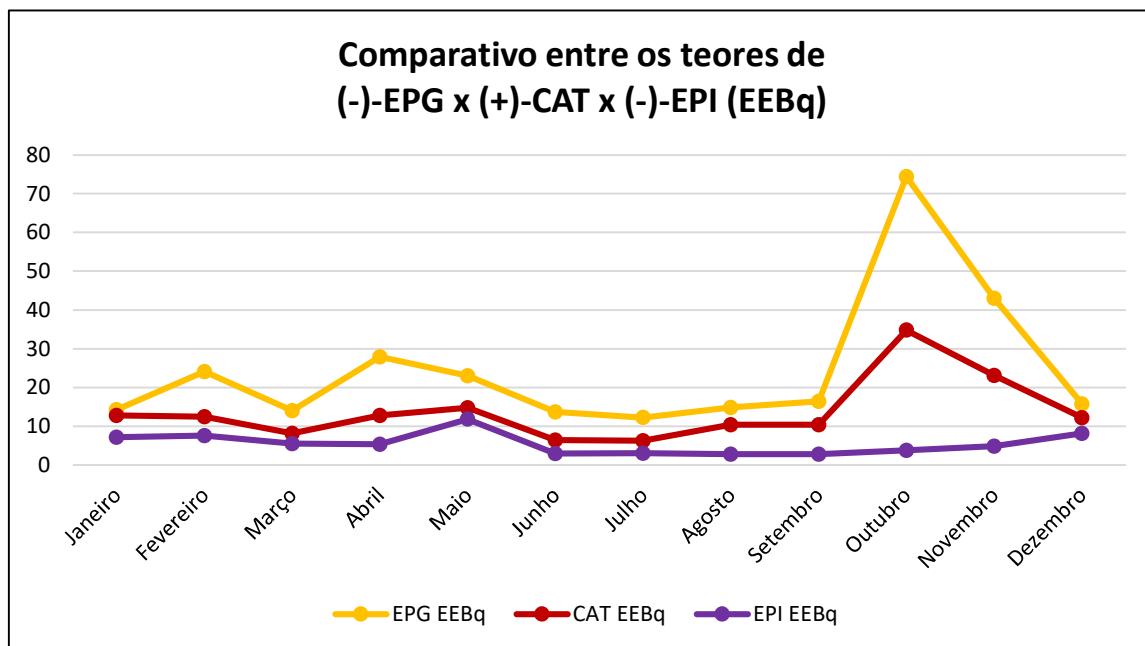
Gráfico 69. Comparativo dos teores dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* (EEB) obtidos de Janeiro a Dezembro de 2017.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 70. Comparativo dos teores dos marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina ($n = 3$) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* submetidos ao *Quenching* (EEBq) obtidos de Janeiro a Dezembro de 2017



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Os teores de (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI) encontrados nos extratos etanólicos brutos e nos extratos etanólicos submetidos ao *quenching* de *Monteverdia obtusifolia*, obtidos entre os meses de janeiro a dezembro de 2017, aliados aos valores encontrados nos doseamentos de flavonoides totais e fenólicos totais, distribuídos ao longo do ano, confirmam a riqueza do conteúdo fenólico encontrado na espécie em estudo quando comparados aos valores observados em diferentes espécies do gênero (YARIWAKE *et al.*, 2005; RADOMSKI, 2006; SILVA *et al.*, 2009; LIMA; VARGAS; POHLIT, 2010; SAGWAN; RAO; SHARMA, 2011; HAIDA *et al.*, 2012; SCHWANZ, 2012; AHMED; McGAW; ELLOF, 2013; WELI *et al.*, 2014; ARAÚJO, 2015; CANSIAN *et al.*, 2015; NERI, 2016; ABREU-NARANJO *et al.*, 2018; MARIÑO *et al.*, 2019; KPAYIZOUN, 2020; PEREIRA *et al.*, 2020; SCHINDLER *et al.*, 2020).

Os flavan-3-óis também designados de catequinas, constituem uma classe dos flavonoides que não apresentam o grupamento carbonílico na posição C4 e também não possuem conjugação entre os anéis A e B. Estes

metabólitos constituem as unidades precursoras das proantocianidinas. (KÖHLER *et al.*, 2008).

Devido aos seus variados efeitos fisiológicos, o grupo das catequinas atrai grande interesse dos pesquisadores. Nos vegetais, estão relacionadas aos sinais químicos para atração ou dissuasão de insetos e à defesa contra agentes patogênicos e tensões ambientais (WANG *et al.*, 2012; NIERO *et al.*, 2011). No que diz respeito à sua estrutura, catequina e epicatequina possuem dois centros quirais. Portanto, é importante salientar que as propriedades das substâncias com centro quiral como (+)-catequina e (-)-epicatequina e seus enantiômeros dependem da conformação das moléculas. Consequentemente, alguns estudos demonstraram efeitos fisiológicos diferentes para cada enantiômero (DONOVAN, 2006; CAO *et al.*, 2006).

Durante a biossíntese catequina e epicatequina são predominantemente sintetizados como (+)-catequina e (-)-epicatequina. Os enantiômeros (-)-catequina e (+)-epicatequina, frequentemente referidos como *ent*-catequina e *ent*-epicatequina, raramente ocorrem na natureza e sua presença parece ser induzida por ações enzimáticas (KOFINK *et al.*, 2007).

O doseamento dos marcadores (EPG), (CAT) e (EPI) forneceu resultados diferentes ao longo do ano para os extratos (EEB) e (EEBq). Foi possível observar valores máximos no conteúdo de (EPG) no mês de outubro de 2017 para o EEB (44,93 µg/mg extrato \pm 0,39) e os menores valores foram registrados no mês de julho de 2017 (9,79 µg/mg extrato \pm 0,41). De modo semelhante, o mês de outubro (22,38 µg/mg extrato \pm 0,31) e julho (6,23 µg/mg extrato \pm 0,12) apresentaram os maiores e menores teores do marcador (CAT), respectivamente. Para o marcador (EPI), ainda sobre o EEB, o valor máximo registrado correspondeu ao extrato obtido no mês de maio de 2017 (8,78 µg/mg extrato \pm 0,06), enquanto o menor valor obtido no extrato referente ao mês de agosto de 2017 (3,70 µg/mg extrato \pm 0,10).

Em relação aos extratos (EEBq), o marcador (EPG) apresentou valores máximos (74,41 µg/mg extrato \pm 0,16) e mínimos (12,25 µg/mg extrato \pm 0,05) nos meses de outubro e julho de 2017, respectivamente. O marcador (CAT), conforme ocorrido para os extratos EEB, também apresentou comportamento similar com os maiores valores ocorrendo em outubro (34,80 µg/mg extrato \pm 0,62) e menores em julho (6,26 µg/mg extrato \pm 0,09). E para o marcador (EPI),

o valor máximo observado foi registrado no mês de maio ($11,85 \mu\text{g}/\text{mg}$ extrato $\pm 0,25$), enquanto o menor valor encontrado correspondeu ao extrato obtido no mês de agosto ($2,80 \mu\text{g}/\text{mg}$ extrato $\pm 0,02$).

A análise comparativa dos marcadores entre os diferentes tipos de extratos ao longo dos meses reflete a complexidade do metabolismo vegetal, visto que existe uma distribuição não padronizada na produção destas substâncias e épocas específicas do ano. Entretanto, foi possível observar que o perfil de produção de EPG e CAT apresentam similaridade ao longo dos meses conforme Gráfico 69.

Conforme observado anteriormente, no ensaio de doseamento de flavonoides totais, é possível correlacionar os maiores índices de catequinas aos meses do ano em que apresentaram altos teores de flavonoides como os meses de maio e outubro. Também foi possível verificar que os meses que apresentaram menor produção de catequinas foram os meses observados com os menores teores de flavonoides totais e fenólicos totais. Estes resultados concordam com os dados descritos por Oliveira *et al.* (1998), que destacam o acúmulo de substâncias nos órgãos subterrâneos das espécies durante o inverno, para a posterior mobilização no início da primavera.

Somados a estes dados, os grandes índices pluviométricos contínuos podem resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação (WATERMAN; MOLE, 1994; EVANS, 1996). Ao avaliar o teor de substâncias fenólicas nas folhas de *C. sinensis* e sua relação à precipitação, Ahmed *et al.* (2014), verificaram redução significativa nos níveis dos marcadores ácido gálico, catequina, epigalocatequina, galocatequina, catequina galato, epicatequina galato, epigalocatequina galato e galocatequina galato no período das chuvas. De acordo com Wang *et al.* (2011), a estação chuvosa levou a uma redução do conteúdo total de catequinas nas folhas da espécie, incluindo epicatequina, epigalocatequina e seus derivados galoilados. Os autores concordam que o impacto da sazonalidade climática, sobre as concentrações de metabólitos secundários, varia com base em outros fatores, como os cultivares e a geografia (MUTUKU *et al.*, 2016; JAYASINGHE; KUMAR, 2021).

Corroborando o comportamento encontrado dos marcadores, destacam-se os resultados observados por Harborne (1994), Radomski (2006) e Radomski e Bull (2010) que verificaram que o teor de polifenóis varia de acordo com a

luminosidade, sendo maior nas plantas que crescem a pleno sol em relação às plantas de sombra. Esta tendência é coerente com o papel fotoprotetor dos fenóis, inclusive os flavonoides, na defesa das espécies vegetais.

A ausência de estudos com quantificação específica dos flavanóis de espécies do gênero *Monteverdia*, não permitem confirmar o comportamento destes marcadores frente às variações citadas. Entretanto, em pesquisas realizadas com a espécie *C. sinensis*, caracterizada por apresentar profusão de flavanóis em sua composição, foi possível observar que o processo de sombreamento das plantas promove alteração nas rotas metabólicas e redução nos teores de EPG, CAT e EPI, bem como nos seus derivados galolilados e demais metabólitos desta classe, enquanto a exposição solar proporciona efeito contrário (HONG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017; ZHANG; LIU; RUAN, 2017; SONG *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2019). De acordo com Zheng *et al.* (2008) a radiação UV-B promove o acúmulo de catequinas nas plantas, entretanto, o excesso de exposição pode danificar os tecidos vegetais e reduzir os seus teores.

Outro comportamento observado no presente estudo, após a análise dos dados, é a diferença entre os teores obtidos para os marcadores em relação ao tipo de extrato. Os extratos etanólicos secos submetidos ao *Quenching* (EEBq) apresentaram teores próximos e até superiores aos valores obtidos com os extratos etanólicos secos (EEB), o que demonstra a capacidade da técnica em preservar o conteúdo químico durante o momento da coleta, visto que o (EEBq) apresenta conteúdo de água de 30 a 40% superior ao material utilizado para a produção do (EEB). Estes resultados corroboram com as recomendações publicadas por Kim; Verpoorte (2009) e Schripsema (2009), que orientam o congelamento das folhas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta a fim de cessar as reações metabólicas do organismo e assim, saber com precisão, posteriormente, como estava o metaboloma da planta naquele momento.

Em estudos de cinética e estabilidade térmica das catequinas realizados por Wang *et al.* (2006) e Saklar *et al.* (2015), foi possível evidenciar a existência de estabilidade térmica dos metabólitos até temperaturas de 85°C, após estes valores, é iniciado o processo de epimerização, polimerização e degradação das mesmas. Durante o aquecimento prolongado são aumentados os teores de (+)-Catequina, (-)-Gallocatequina galato e (-)-Gallocatequina e são reduzidos (-)-

Epicatequina, (-)-Epigalocatequina, (-)-Epigalocatequina galato e (-)-Epicatequina galato.

Negri, Possamai e Nakashima (2009) pesquisaram a influência da temperatura de secagem no teor de metabólitos secundários da *Maytenus ilicifolia* e verificaram que ocorre diminuição nos seus valores conforme o aumento da temperatura. A temperatura de 40°C mostrou-se mais eficaz na secagem das folhas que apresentaram maiores rendimentos de princípios ativos. Desta forma, estes dados refutam a possibilidade de degradação significativa dos marcadores no material vegetal submetido à estufa a 40°C.

Ao analisar a rota biossintética dos flavonoides, em especial dos flavan-3-óis, é possível verificar que a (+)-Catequina e (-)-Epicatequina são formados nas etapas finais da rota, conforme pode ser observado na Figura 12 (p. 68) (WANG *et al.* 2014; SANTOS *et al.*, 2021). As catequinas são sintetizadas através da via dos fenilpropanóides e do acetato. Entretanto, a via exata para a biossíntese destes compostos individualmente continua não totalmente determinada. Nos anos 90, Stafford (1990) propôs que a (CAT) seria um intermediário isomérico na conversão da (+)-diidroqueracetina para a (EPI), mas estudos recentes demonstraram que a síntese de (CAT) e (EPI) são catalisadas a partir da leucocianidina pela leucocianidina redutase (LAR) e antocianidina sintase (ANS), respectivamente (ASHIHARA *et al.*, 2010).

Wellmann *et al.* (2006) verificaram a capacidade da (ANS) converter a (CAT) em dois produtos majoritários e um minoritário, sugerindo que a mesma participa como substrato em outras rotas biossintéticas, o que justifica o seu maior acúmulo nos tecidos vegetais em relação ao seu epímero (EPI).

Em estudo realizado por Wei *et al.* (2011) foi possível observar que existe correlação entre a produção de clorofila e o conteúdo de (CAT) e sua associação à ação das enzimas (ANS) e (LAR). A (LAR) é a única enzima caracterizada para favorecer a conversão da leucocianidina à (CAT) e sua atividade encontra-se reduzida durante o desenvolvimento tecidual. Por outro lado, a (ANS) é uma oxigenase 2-oxoglutarato dependente de ferro, que necessita de oxigênio molecular como substrato para favorecer a formação da (EPI). Dessa forma, o aumento de clorofila (tipo a) durante o desenvolvimento foliar leva a um aumento de (EPI) e (EPG) devido à intensa atividade da (ANS) e redução dos níveis de

(CAT) relacionado à diminuição da atividade da (LAR), confirmando a correlação entre os níveis de clorofila e a composição foliar de (EPG), (CAT) e (EPI).

Os maiores valores encontrados para o marcador (EPG) foram observados nos extratos obtidos do material vegetal referente ao mês de outubro, com destaque para o (EBBq) que apresentou o maior teor ($74,41 \pm 0,16$ $\mu\text{g/mg}$ extrato) entre todos os marcadores avaliados. Estes resultados podem estar relacionados aos altos níveis de radiação associados aos menores índices pluviométricos registrados neste mês. Um comportamento similar a outras espécies vegetais que apresentam maior produção de compostos fenólicos em situação de estresse hídrico (BASU *et al.*, 2016; GHARIBI *et al.*, 2019; GU *et al.*, 2020).

Em contrapartida, os menores índices observados para os marcadores avaliados (EPG, CAT, EPI) foram detectados nos materiais vegetais referentes aos meses de junho e julho de 2017. As menores incidências de radiação e maiores índices pluviométricos podem estar relacionados aos valores encontrados.

Em relação à proporção dos marcadores, foi possível observar maior prevalência do marcador EPG frente à CAT e EPI, estes valores podem ser resultado das diferentes rotas metabólicas envolvidas na produção destes compostos, além da necessidade fisiológica da espécie, bem como sua resposta ao ambiente em que se encontra. A produção de EPG decorre da atuação da (LAR) sobre a leucodelfinidina que é obtida a partir da metabolização da diidromiricetina via (DFR). Enquanto que as produções de CAT e EPI estão associadas às atuações da leucoantocianidina reutase (LAR) e antocianidina redutase (ANR) sobre o mesmo intermediário (leucocianidina), o que pode promover competição das enzimas pelo mesmo substrato, podendo resultar em menores valores detectáveis (SANTOS *et al.*, 2021).

Hamauzu *et al.* (1999) avaliaram o comportamento das catequinas na sinalização vegetal em *Malus pumila* M. De acordo com os autores, foi possível observar uma correlação entre o acúmulo de (EPI) e o desenvolvimento de flores e frutos após a polinização, o que indica uma possível atividade deste marcador no metabolismo vegetal. De forma contrária, existe um decréscimo nos teores do marcador (CAT) após o processo de polinização. Estes resultados são semelhantes aos valores encontrados nos meses de outubro, novembro e

dezembro para os marcadores em estudo, visto que o período de floração e frutificação da espécie *Monteverdia obtusifolia* coincide com os mesmos (outubro – janeiro).

Desse modo, para fins de obtenção de produtos fitoterápicos utilizando o material vegetal de *M. obtusifolia*, recomenda-se a colheita no mês de outubro, em que há maior produção dos marcadores EPG, CAT e EPI em relação aos demais meses do ano, visto que os mesmos podem estar associados às atividades gatroprotetora e antiulcerogênica relacionadas à espécie (MABE *et al.*, 1999; ANKOLEKAR *et al.*, 2011; ROZZA *et al.*, 2012; DÍAZ-GOMÉZ *et al.*, 2013; PASTENE *et al.*, 2014).

Os dados de (EPG) nos extratos EEB foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (1485,01) para a (EPG) no EEB foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), sugerindo que há diferença estatística entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. Confirmando esta teoria, o valor-P foi de $3,37 \times 10^{-31} < 0,05$. O valor calculado de F (14532,99) para o EEBq também foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), assim como o valor-p ($4,47 \times 10^{-43} < 0,05$), rejeitando a hipótese nula em que as amostras são consideradas iguais para o marcador (EPG) nos dois tipos de extratos, conforme observado nas Tabelas 76 e 78. O pós-teste de Tukey confirma que existem diferenças significativas entre as médias encontradas para o marcador (EPG) nos dois tipos de extratos, indicando que o teor do marcador sofre influência do fator sazonal apresentando resultados variáveis ao longo do ano (Tabelas 77 e 79).

Os dados de (CAT) nos extratos EEB foram submetidos ao teste de ANOVA *one way* seguido de teste complementar de Tukey, onde foi possível observar que o valor calculado de F (2836,83) para a (CAT) no EEB foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), sugerindo que há diferença estatística entre os resultados obtidos para um nível de confiança de 95%. Confirmando esta teoria, o valor-P foi de $1,45 \times 10^{-34}$, menor que 0,05. O valor calculado de F (3650,08) para o EEBq também foi superior ao valor de Fcrítico (2,21), assim como o valor-p ($7,04 \times 10^{-36}$) inferior a 0,05, rejeitando a hipótese nula em que as amostras são consideradas iguais para o marcador (CAT) nos dois tipos de extratos, conforme observado nas Tabelas 80 e 82. O pós-teste de Tukey confirma que existem diferenças significativas entre as médias encontradas para o marcador (CAT)

nos dois tipos de extratos, indicando que o teor do marcador sofre influência do fator sazonal apresentando resultados variáveis ao longo do ano (Tabelas 81 e 83).

De modo semelhante, os dados de (EPI) nos extratos EEB foram submetidos à análise de variância e foi possível observar que o valor calculado de F (1080,46) > Fcrítico (2,21), e o valor-p ($1,52 \times 10^{-29}$) < 0,05. Para o EEBq, foram observados valor calculado de F (1975,75) > Fcrítico (2,21), e o valor-p ($1,1 \times 10^{-32}$) < 0,05 rejeitando a hipótese nula em que as amostras são consideradas iguais para o marcador (EPI) nos dois tipos de extratos, conforme observado nas Tabelas 84 e 86. O pós-teste de Tukey também confirmou que existem diferenças significativas entre as médias encontradas para o marcador (EPI) nos dois tipos de extratos, indicando que o marcador também sofre influência do fator sazonal (Tabelas 85 e 87).

Tabela 76. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPG dos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEB EPG

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3267,77	11	297,07	1485,009	3,37E-31	2,216309
Dentro dos grupos	4,801102	24	0,200046			
Total	3272,571	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística

F; p-valor: probabilidade exata

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 77. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPG no EEB.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,000158	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,00018
FEV	9,633		0,000143	0,000143	0,00957	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	1
MAR	32,45	42,08		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,216	0,000143	0,000143	0,000143
ABR	22,21	12,57	54,65		0,00587	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
MAI	15,77	6,138	48,22	6,435		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,004525
JUN	46,62	56,25	14,17	68,82	62,39		0,000143	0,001065	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
JUL	64,32	73,96	31,88	86,53	80,09	17,71		0,000147	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
AGO	54,1	63,73	21,65	76,3	69,87	7,479	10,23		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
SET	28,4	38,03	4,049	50,6	44,17	18,22	35,93	25,7		0,000143	0,000143	0,000143
OUT	71,62	61,99	104,1	49,42	55,85	118,2	135,9	125,7	100		0,000143	0,000143
NOV	13,6	23,24	18,84	35,81	29,38	33,01	50,72	40,49	14,79	85,23		0,000143
DEZ	9,182	0,4513	41,63	13,02	6,59	55,8	73,51	63,28	37,58	62,44	22,79	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 78. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPG dos extratos etanólicos submetidos ao *Quenching* (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEBq EPG

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	10691,72	11	971,9746	14532,99	4,47E-43	2,216309
Dentro dos grupos	1,605134	24	0,066881			
Total	10693,33	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 79. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPG no EEBq.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		0,000143	0,9902	0,000143	0,000143	0,2944	0,000143	0,1863	0,000143	0,000143	0,000143	0,000147
FEV	66,28		0,000143	0,000143	0,001814	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
MAR	1,591	67,87		0,000143	0,000143	0,9098	0,000143	0,01777	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
ABR	91,95	25,68	93,54		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
MAI	59,13	7,147	60,72	32,82		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
JUN	3,787	70,06	2,196	95,74	62,91		0,000159	0,00053	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
JUL	13,4	79,67	11,81	105,4	72,53	9,612		0,000143	0,000143	0,000143	0,000143	0,000143
AGO	4,167	62,11	5,758	87,78	54,96	7,954	17,57		0,000145	0,000143	0,000143	0,01067
SET	14,72	51,56	16,31	77,23	44,41	18,51	28,12	10,55		0,000143	0,000143	0,1229
OUT	404,4	338,1	406	312,4	345,3	408,2	417,8	400,2	389,7		0,000143	0,000143
NOV	193,4	127,1	195	101,4	134,3	197,2	206,8	189,2	178,7	211		0,000143
DEZ	10,24	56,04	11,83	81,71	48,89	14,03	23,64	6,072	4,481	394,2	183,1	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 80. Análise de variância (ANOVA) do teor de CAT dos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEB CAT

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	644,906	11	58,62782	2836,8299	1,45E-34	2,216309
Dentro dos grupos	0,496	24	0,020667			
Total	645,402	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 81. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de CAT no EEB.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,9993	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	1	0,0001468
FEV	23,65		0,0001429	0,0323700	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAR	48,68	72,33		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001455	1	0,0001429	0,0001429
ABR	29,04	5,382	77,71		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAI	1,165	24,82	47,51	30,2		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,9964	0,0001432
JUN	63,74	87,39	15,06	92,77	62,57		0,0001429	0,1074	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	88,96	112,6	40,28	118	87,79	25,22		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	59,16	82,81	10,48	88,19	57,99	4,578	29,8		0,0001445	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	48,47	72,13	0,2008	77,51	47,31	15,26	40,48	10,68		0,0001429	0,0001429	0,0001429
OUT	105,7	82,01	154,3	76,63	106,8	169,4	194,6	164,8	154,1		0,0001429	0,0001429
NOV	0,24	23,41	48,92	28,8	1,406	63,98	89,2	59,4	48,72	105,4		0,0001494
DEZ	10,28	13,37	58,96	18,76	11,45	74,02	99,24	69,44	58,76	95,38	10,04	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 82. Análise de variância (ANOVA) do teor de CAT dos extratos etanólicos submetidos ao Quenching (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEBq CAT						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2103,351	11	191,2137	3650,0845	7,04E-36	2,216309
Dentro dos grupos	1,257267	24	0,052386			
Total	2104,608	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 83. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de CAT no EEBq.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,7737	0,0001429	1	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,1816
FEV	2,623		0,0001429	0,7834	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,9914
MAR	34,79	32,16		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001455	0,0001429	0,0001429	0,0001429
ABR	0,02523	2,598	34,76		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,1875
MAI	15,08	17,71	49,87	15,11		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001432
JUN	48,05	45,43	13,27	48,03	63,14		0,9996	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	49,16	46,54	14,38	49,14	64,25	1,11		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	18,14	15,51	16,65	18,11	33,22	29,92	31,03		1	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	17,78	15,16	17	17,76	32,87	30,27	31,38	0,3532		0,0001429	0,0001429	0,0001429
OUT	166,8	169,5	201,6	166,9	151,8	214,9	216	185	184,6		0,0001429	0,0001429
NOV	78,02	80,64	112,8	78,05	62,94	126,1	127,2	96,16	95,8	88,82		0,0001429
DEZ	4,187	1,564	30,6	4,162	19,27	43,87	44,98	13,95	13,6	171	82,21	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 84. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPI dos extratos etanólicos secos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEB EPI						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	99,83432	11	9,075847	1080,458	1,52E-29	2,216309
Dentro dos grupos	0,2016	24	0,0084			
Total	100,0359	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 85. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPI no EEB.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN		0,01364	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001431	0,0001429	0,0001436
FEV	5,921		0,0001433	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,01852	0,0001429	0,0001429
MAR	17,2	11,28		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001455	0,0001429	0,02507	0,0001531	0,0001429
ABR	32,57	38,49	49,77		0,0001429	0,0001460	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
MAI	41,32	35,4	24,13	73,89		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001432
JUN	42,96	48,88	60,16	10,39	84,29		0,1739	0,0001430	0,2762	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	47,18	53,1	64,38	14,61	88,51	4,221		0,001038	1	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	54,68	60,6	71,88	22,11	96	11,72	7,496		0,0005951	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	46,8	52,73	64	14,24	88,13	3,843	0,378	7,874		0,0001429	0,0001429	0,0001429
OUT	11,65	5,732	5,543	44,22	29,67	54,62	58,84	66,33	58,46		0,0001429	0,0001429
NOV	27,02	21,1	9,827	59,59	14,3	69,99	74,21	81,7	73,83	15,37		0,0001429
DEZ	4,187	1,564	30,6	4,162	19,27	43,87	44,98	13,95	13,6	171		82,21

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 86. Análise de variância (ANOVA) do teor de EPI dos extratos etanólicos submetidos ao Quenching (EEBq) de *Monteverdia obtusifolia* Mart.

ANOVA EEBq EPI						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	254,2788	11	23,11625	1975,748	1,1E-32	2,216309
Dentro dos grupos	0,2808	24	0,0117			
Total	254,5596	35				

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; gl: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela 87. Dados da análise do pós-teste de Tukey no software Past® para o teor de EPI no EEBq.

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
JAN	0,01356	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
FEV	5,925		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001503
MAR	26,21	32,13		0,619	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001455	0,0001429	0,0001429	0,0001442	0,0001429
ABR	29,2	35,12	2,989		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0006667	0,0001429
MAI	74,89	68,96	101,1	104,1		0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUN	67,52	73,45	41,31	38,32	142,4		0,9831	0,8348	0,9116	0,0001429	0,0001429	0,0001429
JUL	65,81	71,74	39,61	36,62	140,7	1,708		0,1873	0,2595	0,0001429	0,0001429	0,0001429
AGO	69,98	75,9	43,77	40,78	144,9	2,455	4,163		1	0,0001429	0,0001429	0,0001429
SET	69,71	75,63	43,5	40,51	144,6	2,188	2,896	0,2669		0,0001429	0,0001429	0,0001429
OUT	54,82	60,74	28,61	25,62	129,7	12,7	11	15,16	14,89		0,0001429	0,0001429
NOV	36,99	42,91	10,78	7,793	111,9	30,53	28,82	32,99	73,83	17,83		0,0001429
DEZ	15,91	9,981	42,11	45,1	59,98	83,43	81,72	85,88	35,72	70,72	52,9	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A avaliação comparativa entre os teores dos marcadores presentes nos extratos submetidos aos diferentes tipos de tratamento (EEB e EEBq), permitiram verificar que não existem diferenças estatísticas significativas, em um intervalo de confiança de 95% para os compostos em análise. Os resultados obtidos através do teste ANOVA one way para EPG, CAT e EPI foram ($F_{\text{calc}} 0,021 < F_{\text{crítico}} 3,98$; valor-P $0,885 > 0,05$), ($F_{\text{calc}} 0,520 < F_{\text{crítico}} 3,98$; valor-P $0,473 > 0,05$) e ($F_{\text{calc}} 0,939 < F_{\text{crítico}} 3,98$; valor-P $0,336 > 0,05$), respectivamente, aceitando-se a hipótese nula que as amostras são semelhantes. Em seguida, realizou-se o teste t de student que confirmou ausência de diferença entre os tratamentos para EPG ($t_{\text{calc}} 0,146 < t_{\text{crít}} 2,004$; valor-P $0,885 > 0,05$), CAT ($t_{\text{calc}} 0,721 < t_{\text{crít}} 2,004$; valor-P $0,474 > 0,05$) e EPI ($t_{\text{calc}} 0,969 < t_{\text{crít}} 2,000$; valor-P $0,336 > 0,05$). Desta forma, foi possível observar que o tratamento alternativo proposto (*quenching*) não interferiu na preservação dos níveis de flavanóis no material vegetal de *M. obtusifolia*.

5.5 Desreplicação do extrato etanólico de *Monteverdia obtusifolia* (Mart) Biral

O extrato etanólico bruto das folhas de *M. obtusifolia* secas em estufa (EEBSE), obtidas no mês de novembro de 2017 apresentou um maior teor de fenólicos totais e flavonoides nas quantificações realizadas, desta forma, esse extrato foi priorizado para desreplicação. Os dados referentes aos espectros EM³ no modo negativo foram comparados com os perfis de fragmentação disponíveis

na literatura, permitindo identificar tentativamente 25 compostos (Tabela 88, Figura 47), apresentando flavonóis O-glicosilados, flavanona C-glicosilada, flavan-3-ol, ácido fenólico e procianidinas.

O composto 9 exibiu o íon precursor com m/z 325 ($[M-H]^-$), no espectro de EM² apresentou íon fragmento com m/z 163, indicando a perda de uma unidade de hexose (162 Da), o espectro de EM³ [325→163] exibiu o íon fragmento com m/z 119, indicando a perda de 44 Da, esta perda é característica de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, devido à perda neutra de unidade CO₂. Este perfil de fragmentação comparado com a literatura permitiu identificar tentativamente o pico 9 como ácido *p*-cumárico-O-hexosídeo (SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015).

As procianidinas são formadas por diferentes graus de polimerização de unidades de flavan-3-ol, sua presença pode ser facilmente vista por espectrometria de massas, devido aos mecanismos de fragmentação característicos, fissão heterocíclica do anel B (FH) com perda de 126 Da, Retro Diels-Alder (RDA) e fissão quinonametídeo (FQM) que promove a quebra da ligação interflavânica. O íon precursor com m/z 577 e seus isômeros (3, 8, 11 e 15) exibiram os íons fragmentos com m/z 559 $[M-H-18]^-$, indicando perda de água; m/z 451 $[M-H-126]^-$; m/z 425 $[M-H-152]^-$, devido à clivagem RDA; m/z 407 $[M-H-152-18]^-$, correspondente à sucessiva perda de água; e m/z 289, atribuído à clivagem da ligação interflavânica, sendo desta forma, tentativamente identificados como procianidinas do tipo B diméricas (SANNOMIYA *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2011; FRAIGE *et al.*, 2018).

Tabela 88. Caracterização dos compostos fenólicos presentes no EEBSE de *M. obtusifolia* por CLAE-IES-EMⁿ.

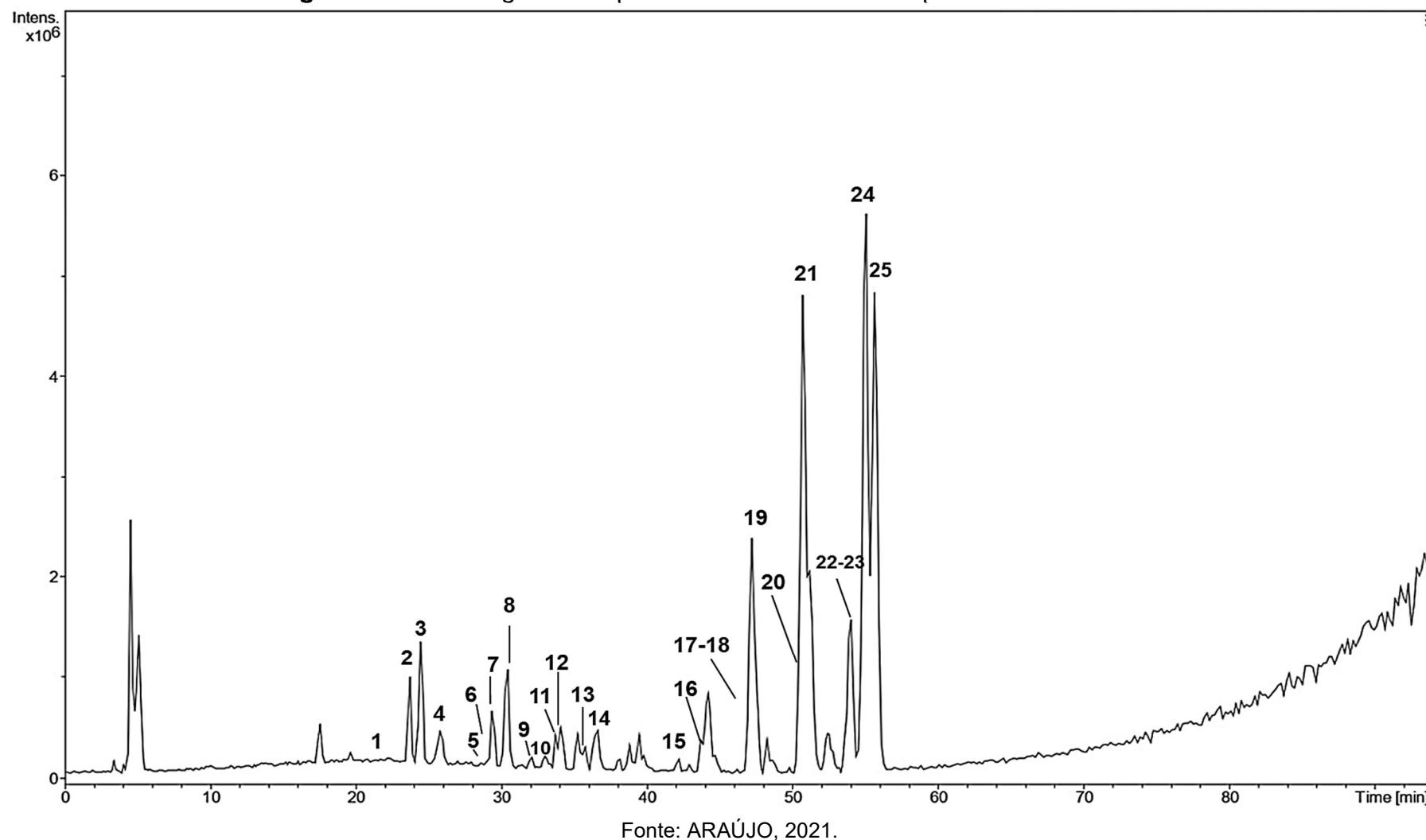
Pico	T.R	[M-H] ⁻	EM ⁿ m/z	Assignment	Referências
1	20,6	305	MS ² [305]: 221, 219, 179 MS ³ [305→179]: 164, 151, 137	(epi)gallocatequina	MENA <i>et al.</i> , 2012
2	23,2	593	MS ² [593]: 467, 425, 407, 303, 289	(epi)gallocatequina →(epi)catequina	FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; ESCOBAR-AVELLO <i>et al.</i> , 2019
3	24,4	577	MS ² [577]: 559, 451, 425, 407, 289 MS ³ [577→425]: 407	Procyanidina tipo B dímero I	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018
4	25,8	593	MS ² [593]: 467, 441, 423, 305, 287	(epi)catequina→(epi) gallocatequina	FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; ESCOBAR-AVELLO <i>et al.</i> , 2019
5	28,6	561	MS ² [561]: 435, 407, 289 MS ³ [561→289]: 245, 205, 179	(epi)afzelequina→(epi)catequina	SOUZA <i>et al.</i> , 2008; DEL BUBBA <i>et al.</i> , 2012
6	29,0	305	MS ² [305]: 221, 219, 179 MS ³ [305→179]: 164, 151, 137	(epi)gallocatequina	MENA <i>et al.</i> , 2012
7	29,3	289	MS ² [289]: 245, 205, 203, 179 MS ³ [289→245]: 203, 227, 187, 175, 161	Catequina	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 2012
8	30,4	577	MS ² [577]: 559, 451, 425, 407, 289 MS ³ [577→425]: 407	Procyanidina tipo B dímero II	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018

9	32,5	325	MS ² [325]: 163, 119 MS ³ [325→163]: 119	Ácido <i>p</i> -cumárico-O-hexosideo	FANG; YU; PRIOR, 2002; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015
10	33,0	865	MS ² [865]: 713, 695, 577, 575, 451, 425, 407	Procanidina trímero	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 2012; LIN <i>et al.</i> , 2014
11	33,7	577	MS ² [577]: 559, 451, 425, 407, 289 MS ³ [577→425]: 407	Procanidina tipo B dímero III	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018
12	34,1	595	MS ² [595]: 505, 475, 415, 385, 355 MS ³ [595→355]: 235, 209, 167	Naringenina-6,8-di-C-hexosídeo	QIAO <i>et al.</i> , 2011; LI <i>et al.</i> , 2016
13	35,8	771	MS ² [771]: 609, 300, 301, 272	Quercetina-O-hexose-rutinosídeo	MOSIC <i>et al.</i> , 2019; ALVES <i>et al.</i> , 2020
14	36,4	289	MS ² [289]: 245, 205, 203, 179 MS ³ [289→245]: 203, 227, 187, 175, 161	Epicatequina	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 2012
15	42,2	577	MS ² [577]: 559, 451, 425, 407, 289 MS ³ [577→425]: 407	Procanidina tipo B dímero IV	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018
16	43,8	755	MS ² [755]: 609, 300, 301 MS ³ [755→300]: 271, 272, 256, 179, 151	Quercetina-O-deoxihexosídeo - O-rutinosideo	LLORENT-MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2016; PIANOSKI <i>et al.</i> , 2020
17	46,1	625	MS ² [625]: 463, 317, 316 MS ³ [625→316]: 287, 271, 151	Miracetina hexose deoxihexosídeo	BYSTROM <i>et al.</i> , 2008; HADJADJ <i>et al.</i> , 2020
18	46,3	479	MS ² [479]: 317, 316	Miracetina-3-O-hexosídeo	CELLI <i>et al.</i> , 2011

			MS ³ [479→316]: 287, 271, 179, 151		
19	47,2	739	MS ² [739]: 593, 285, 284 MS ³ [739→284]: 257, 241, 229, 213, 151	Kaempferol-O-deoxihexosídeo-O-rutinosídeo	GALAVERNA <i>et al.</i> , 2015; FARAG <i>et al.</i> , 2020
20	50,4	463	MS ² [463]: 343, 301, 300 MS ³ [463→301]: 273, 257, 229, 179, 151	Quercetina-3-O-hexosídeo	WANG <i>et al.</i> , 2015
21	50,7	609	MS ² [609]: 301 MS ³ [609→301]: 273, 257, 229, 179, 151	Rutina	SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2015; WANG <i>et al.</i> , 2015
22	54,1	593	MS ² [593]: 447, 285, 284 MS ³ [593→285]: 257, 243, 241, 229, 213, 199, 151	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	FABRE <i>et al.</i> , 2001; ZHOU <i>et al.</i> , 2018
23	54,2	447	MS ² [447]: 301 MS ³ [447→301]: 273, 257, 179, 151	Quercetina-O-deoxihexosídeo	PASCALE <i>et al.</i> , 2020
24	55,0	593	MS ² [593]: 447, 285 MS ³ [593→285]: 257, 243, 241, 229, 213, 199, 151	Kaempferol-O-rutinosídeo	FABRE <i>et al.</i> , 2001; ZHOU <i>et al.</i> , 2018
25	55,6	623	MS ² [623]: 477, 315, 314, 300 MS ³ [623→315]: 300, 271, 272, 255, 151	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo	GU <i>et al.</i> , 2011; WANG <i>et al.</i> , 2015; ZHENG <i>et al.</i> , 2019

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 47. Cromatograma do pico base do EEBSE da espécie de *M. obtusifolia*.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

O perfil de fragmentação dos íons precursores com m/z 593 e 561 exibiu percas características de RDA, FH e FQM (tabela 88) permitindo propor a presença das procianidinas (epi)gallocatequina→(epi)catequina (2), (epi)catequina→(epi)gallocatequina (4) e (epi)afzelequina→(epi)catequina (5) (FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; SOUZA *et al.*, 2008; DEL BUBBA *et al.*, 2012; ESCOBAR-AVELLO *et al.*, 2019). Após observar o perfil de fragmentação do íon precursor com m/z 865 (10) (tabela 88), este foi proposto como sendo uma procianidina trimérica, ou seja, contendo 3 monômeros em sua composição (SOUZA *et al.*, 2008; ROCKENBACH *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2014). Procianidinas são compostos comuns ao gênero *Monteverdia* e são relatadas nas espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* (SOUZA *et al.*, 2008; BAGGIO *et al.*, 2009; ANTUNES *et al.*, 2020).

Catequina e epicatequina (m/z 289) possuem percas características correspondentes à saída de CO_2 (m/z 245), e clivagem do anel A (m/z 203 e 205), a diferença entre as duas podem ser realizada por comparação com padrões, nas análises com padrões a catequina eluiu primeiro que a epicatequina, como foi observado por Scobar-Avello *et al.*, (2019), desta forma, o composto 7 foi tentativamente identificado como catequina e o 14 como epicatequina. Os íons precursores com m/z 305 (1 e 3), apresentaram íons fragmentos correspondentes a estrutura de flavan-3-ol, sendo estes tentativamente identificado de acordo com a literatura como (epi)gallocatequina (MENA *et al.*, 2012; ROCKENBACH *et al.*, 2012). Em estudos que avaliaram extratos de outras espécies do gênero como *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, também foi possível realizar a identificação destes compostos (SOUZA *et al.*, 2008; ANTUNES *et al.*, 2020).

A presença de diversos flavonóis O-glicosilados foram sugeridos no EEBSE, através das percas de hexose (162 Da), pentose (132 Da), deoxihexose (146 Da) e rutinosídeo (308 Da), assim como, pela presença dos íons fragmentos com m/z 317, 301, 285 e 315 referentes ás agliconas miricetina, quercetina, camferol e isoramnetina, respectivamente. A inserção da unidade glicosídica na posição C-3 foi observada nos compostos (18, 20, 22 e 25), devido à observação dos íons correspondentes as cisões heterolítica e homolíticas que ocorrem com a saída da unidade açúcar. Desta forma, foram tentativamente identificados os derivados glicosilados de quercetina (13, 16, 20, 21 e 23), kaempferol (19, 22 e

24), miricetina (17, 18) e isoramnetina (25) (BYSTROM *et al.*, 2008; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2016; PIANOSKI *et al.*, 2020; HADJADJ *et al.*, 2020; CELLI *et al.*, 2011, GALAVERNA *et al.*, 2015; FARAG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2015; FABRE *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2018; GU *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2019).

O íon precursor com *m/z* 595, com tempo de retenção em 34,1 minutos, correspondente ao pico 12 do cromatograma (Figura 47), exibiu perfil de fragmentação característico de flavanona C-glicosídeo, a comparação com os dados da literatura permitiu identificar tentativamente o composto 12 como naringenina-6-8-di-C-hexosídeo (QIAO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2016).

5.6 Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis (PCA)*)

A análise dos resultados de quantificação dos marcadores (flavonoides totais, compostos fenólicos totais, (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina) obtidos no presente estudo, configura-se em um montante de dados. Para melhor análise e verificação das possíveis correlações dos mesmos, optou-se por realizar um estudo de PCA.

Após exame das variáveis, foi possível observar que os extratos etanólicos brutos obtidos a partir dos materiais vegetais expostos à secagem em estufa apresentaram diferenças estatísticas significativas nos teores de flavonoides totais e compostos fenólicos totais em relação aos extratos das folhas que foram submetidas ao *quenching*. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os teores de EPG, CAT e EPI. Deste modo, levando-se em consideração a manutenção dos níveis dos flavan-3-óis monitorados ao longo do estudo e, ainda, o elevado custo para a produção de extratos vegetais com a utilização de nitrogênio líquido, configurando-se como um processo inviável para a produção em escala industrial, submeteram-se ao PCA apenas os dados obtidos dos extratos oriundos de material vegetal seco em estufa.

Uma das principais funções da análise multivariada é summarizar as informações contidas em grandes quantidades de dados, transformando as variáveis originais em uma série muito menor (componentes). Estas novas variáveis são as combinações das originais, explicando a maior variância

possível e removendo as redundâncias existentes. Entre os diversos métodos existentes, os mais utilizados são a análise de agrupamentos e a análise das componentes principais (SANTCHURN *et al.*, 2012).

Para o PCA, utilizou-se a média de cada variável e considerou-se a matriz de correlação dos dados. De acordo com Protásio *et al.* (2013), as componentes principais, obtidas via matriz de covariâncias (grau com que cada variável está linearmente correlacionada com outra), são influenciadas pelas variáveis de maior variância ou pelo efeito da escala dessas variáveis, sendo que esse problema pode ser amenizado se esses componentes forem obtidos por meio da matriz de correlação dos dados originais. Ainda segundo os autores, este procedimento equivale a padronizar as variáveis, pelas respectivas médias e desvios-padrão, permitindo maior precisão na análise. Uma vez determinadas as componentes principais, os seus valores numéricos e as coordenadas de cada variável, denominados de escores, podem ser calculados para cada elemento amostral. Desse modo, os valores de cada componente podem ser analisados, usando-se técnicas de estatísticas usuais como a análise de variância e a análise de regressão, dentre outras (SANTCHURN *et al.*, 2012; ONJIA, 2016).

Para avaliar o padrão de dados climáticos observados na época da coleta (2017), realizou-se a análise de componentes principais utilizando o programa Unscrambler. Organizou-se uma matriz (12 x 6), em cujas linhas e colunas foram dispostas os meses e as variáveis (condições climáticas), respectivamente. Os valores da matriz de dados foram autoescalados, a fim de padronizar suas ordens de grandeza em um mesmo nível, permitindo a análise estatística dos dados.

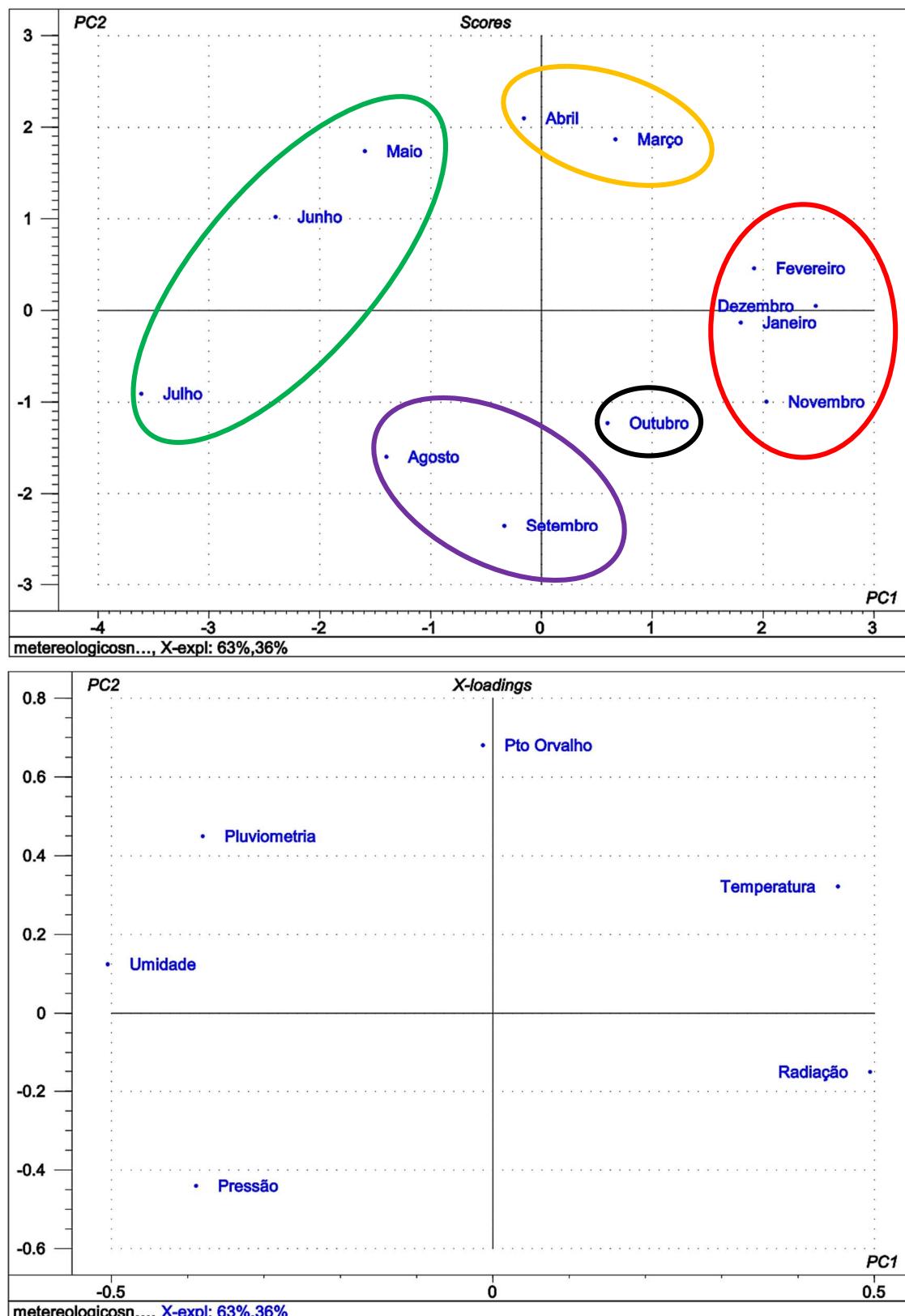
De acordo com o Gráfico 71, observa-se que as duas primeiras componentes principais formadas (PC1 63 %; PC2 36 %) juntas permitiram explicar 99 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras.

Conforme o gráfico de *scores* e *loadings* referentes aos dados climáticos é possível verificar a distribuição diversa dos meses relacionados aos fatores. As amostras agrupadas à direita (Janeiro, Fevereiro, Novembro e Dezembro) são fortemente influenciadas pela radiação solar com os maiores índices registrados. As amostras de (Dezembro e Fevereiro) sofrem, também, maior influência do fator temperatura como os 2 meses mais quentes do ano. De modo

contrário, as amostras agrupadas à esquerda (Junho, Julho e Maio) apresentaram-se como os meses com maior interferência dos fatores pluviométricos e de umidade associados à menor atuação relacionada à variável radiação.

As amostras agrupadas na parte superior do gráfico (Março e Abril) apresentam influência do fator ponto de orvalho associadas às temperaturas mais elevadas. Diametralmente oposta ao ponto de orvalho, a amostra (Setembro) apresenta-se isolada na parte inferior, sendo influenciada pela variável pressão atmosférica. A amostra (Agosto) também apresenta baixa atuação do ponto de orvalho, temperatura e radiação e alta atuação do fator pressão, situando-se no quadrante inferior esquerdo. O *score* (Outubro) demonstra sofrer efeitos inversos à pluviometria, associados à alta radiação e temperatura.

Gráfico 71. Gráficos dos scores e loadings de PC1 e PC2 para os fatores climáticos avaliados.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Análises cromatográficas dos extratos etanólicos brutos obtidos a partir das folhas de *M. obtusifolia* foram submetidas à técnica de Análise de Componente Principal (PCA), posterior ao tratamento realizado na plataforma XCMS, considerando os valores de integrais de área de cada íon e respectivo tempo de retenção. Os gráficos a seguir apresentam a análise multivariada dos resultados da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas dos diferentes meses.

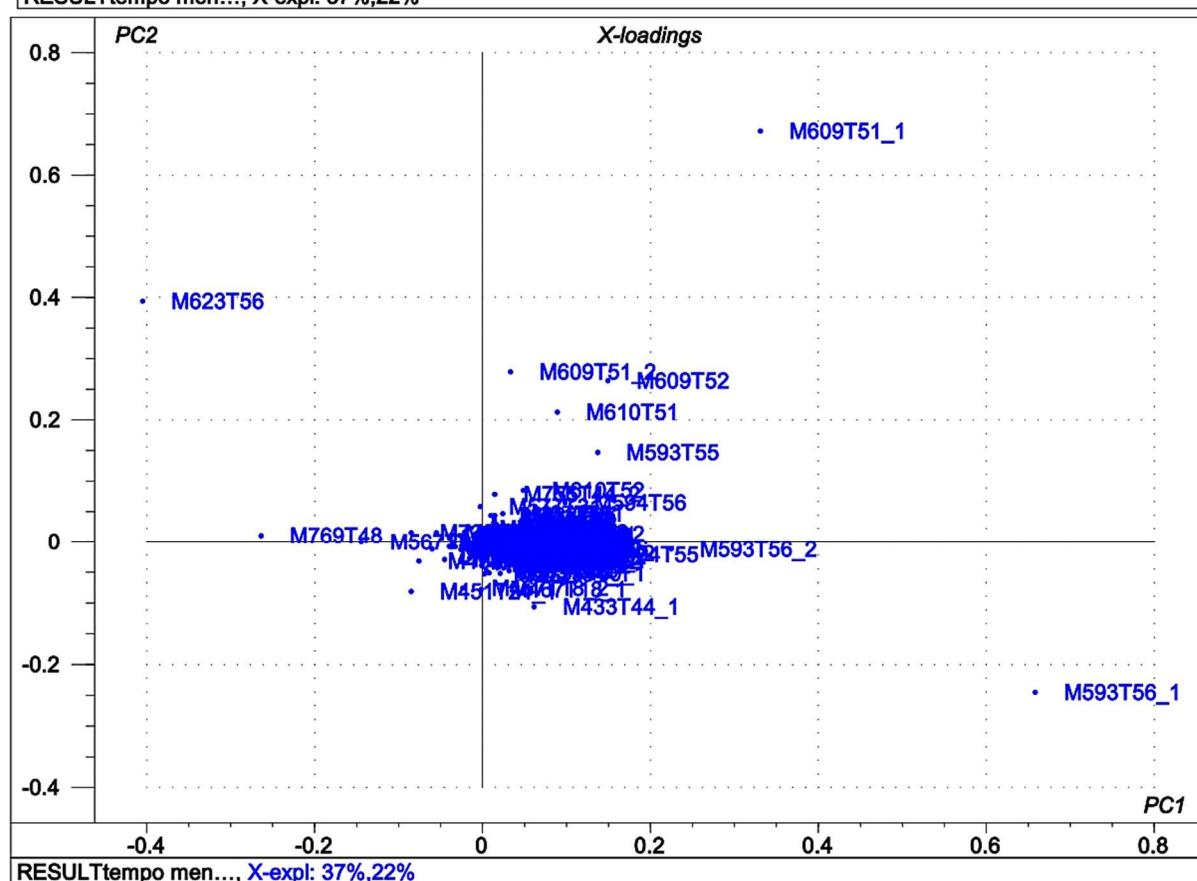
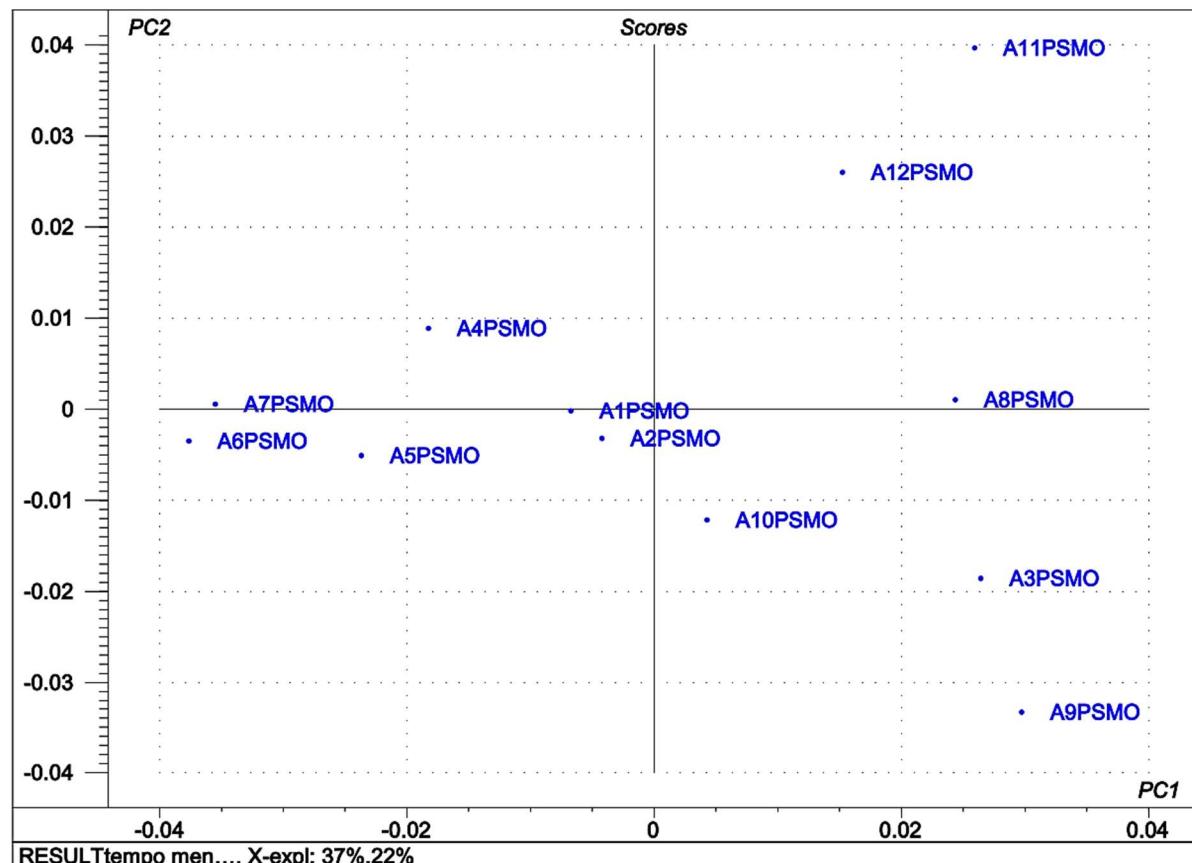
O Gráfico 72 apresenta as duas primeiras componentes principais formadas (PC1 37 %; PC2 22 %) juntas permitiram explicar 59 % da variância total dos resultados, sendo então utilizadas para análise das amostras em questão.

A avaliação do gráfico de *loadings* permitiu a observação do íon m/z 593 relativo ao Kaempferol-3-O-rutinosídeo, que contribui positivamente para PC1 nas amostras referentes aos meses de Março (A3PSMO), Agosto (A8PSMO) e Setembro (A9PSMO). O íon m/z 609 (Rutina) é o responsável pela diferenciação dos meses de Novembro (A11PSMO) e Dezembro (A12PSMO) dos demais.

O íon m/z 433 (não identificado), contribui para o mês de Outubro (A10PSMO). Enquanto o íon m/z 769 (Kaempferol-O-desoxihexose-O-desoxihexose hexosídeo) está associado aos meses de Abril (A4PSMO) e Maio (A5PSMO). Ainda é possível observar a presença do íon m/z 623 (isoramnetina-3-O-rutinosídeo) associado ao mês de Abril.

De acordo com as observações citadas acima, as amostras apesar de apresentarem os flavanóis EPG, CAT E EPI em todos os extratos, revelaram a presença de outros possíveis marcadores que permitem a diferenciação entre os mesmos. Além disto, a variação na composição ao longo do ano, caracteriza o efeito sazonal na constituição química da espécie *M. obtusifolia*.

Gráfico 72. Gráficos dos scores e *loadings* de PC1 e PC2 para os extratos etanólicos brutos obtidos por CL-EM a partir das folhas de *M. obtusifolia* nos meses de Janeiro (A1PSMO) a Dezembro (A12PSMO) de 2017.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Ao longo do desenvolvimento do presente estudo, foi possível realizar a quantificação dos marcadores (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina, bem como os flavonoides totais e compostos fenólicos totais.

Para avaliar o padrão de marcadores observados ao longo do ano (2017), realizou-se o PCA. Organizou-se uma matriz (36 x 5), em cujas linhas e colunas foram dispostas as repetições dos meses e as variáveis (marcadores), respectivamente. Os valores da matriz de dados foram autoescalados, a fim de padronizar suas ordens de grandeza em um mesmo nível, permitindo a análise estatística dos dados.

Conforme pode ser observado no Gráfico 73, os dois primeiros componentes principais formados (PC1 62 %; PC2 18 %), juntos, permitiram explicar 80 % da variância total dos resultados, sendo então utilizados para análise das amostras em questão. As amostras foram nomeadas de acordo com os meses do ano Janeiro (PS1) a Dezembro (PS12), respectivamente. Foi possível combinar as amostras em 4 grupos.

O grupo formado pelas amostras PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, PS12 e suas replicatas, apresentaram valores intermediários das variáveis analisadas, situando-se ao centro do gráfico. Existe homogeneidade entre os teores dos marcadores EPG, CAT e EPI nas amostras que compõem o grupo. Entretanto, pequenas diferenças relacionadas aos compostos fenólicos e flavonoides totais promovem uma distribuição espacial mais adequada entre os meses. PS12 correlaciona-se com a variável compostos fenólicos totais, apresentando maior concentração em relação aos demais meses do grupo. A amostra PS2, evidencia os menores teores de flavonoides totais quantificados ao longo do ano, posicionando-se diametralmente oposto ao *loading* da referida classe. Enquanto PS3, apresenta menores valores de compostos fenólicos e flavonoides totais em relação às demais amostras do grupo.

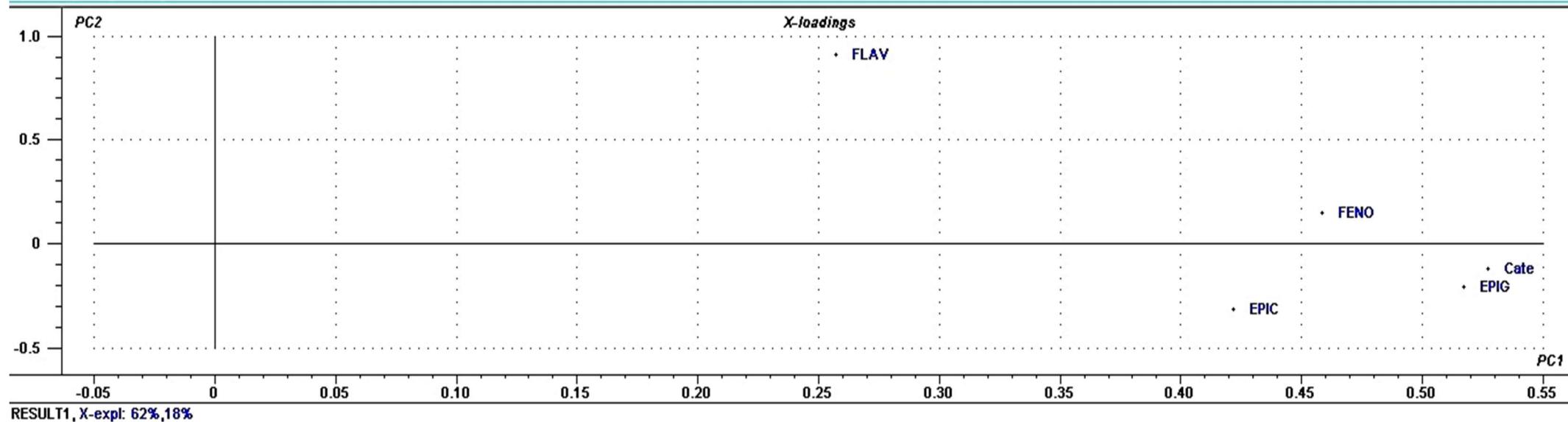
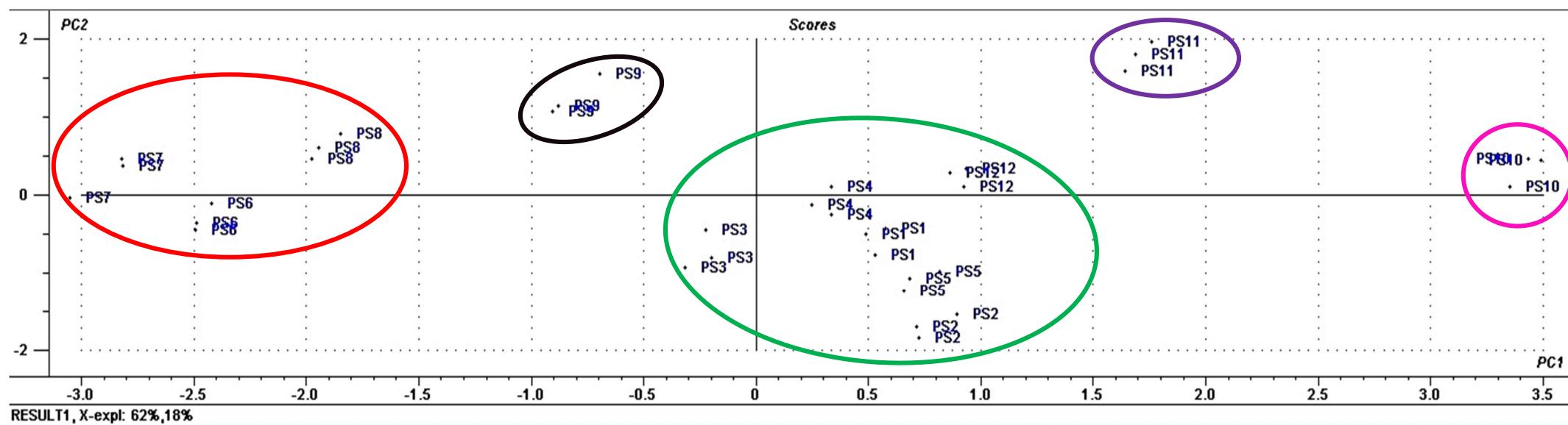
O segundo grupo observado à esquerda é composto pelas amostras de PS6, PS7 e PS8, apresentaram os menores teores de marcadores ao longo do ano, correlacionando-se com os maiores índices pluviométricos, de umidade e menores temperaturas registradas.

O grupo formado pela amostra PS9, apresenta uma discreta elevação dos marcadores EPG, CAT e EPI em relação ao grupo anterior, entretanto, seus maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais promovem uma

separação espacial e confirmam a sua distinção em relação às amostras PS6, PS7 e PS8. A partir do referido mês, foram observadas redução do índice pluviométrico e elevação dos valores de radiação e temperatura registrados.

O grupo posicionado à extrema direita do gráfico referente à amostra PS10, apresenta os maiores teores de EPG, CAT, EPI e fenólicos totais dentre todas as amostras coletadas ao longo do ano. E distingue-se do grupo formado pela amostra PS11 que apresentou o maior índice de flavonoides totais registrados. Desta forma, é possível confirmar a influência da variação sazonal sobre a constituição química dos extratos obtidos a partir das folhas de *M. obtusifolia*.

Gráfico 73. Scores e *loadings* para avaliação dos marcadores nos extratos etanólicos brutos (EEB) das folhas de *M. obtusifolia* obtidos por CLAE-DAD nos meses de Janeiro a Dezembro de 2017.



5.7 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A segunda ferramenta estatística utilizada para análise multivariada dos dados foi a Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (HCA - *Hierarchical Clustering Agglomerative*), esta técnica agrupa as variáveis com base nas características e nas relações entre elas. A classificação é realizada de modo que cada variável seja semelhante a outra no agrupamento com base em um conjunto de características escolhidas. Assim, se houver sucesso no processo de classificação, os objetos dentro dos agrupamentos estarão próximos quando representados graficamente, enquanto os diferentes agrupamentos estarão distantes (HAIR *et al.*, 2009; LANDIM, 2010).

Ao avaliar o conteúdo dos marcadores EPG, CAT, EPI, flavonoides totais e compostos fenólicos totais de *M. obtusifolia* como variáveis de agrupamento, o HCA foi realizado com a distância euclidiana e o agrupamento de ligação de Ward pelo software Knime.

O dendrograma exibido na Figura 48 demonstra que as amostras avaliadas e suas replicatas podem ser categorizadas em 3 grupos. O grupo 1 (G1) contendo as amostras PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, PS9 e PS12; Grupo 2 (G2) contendo PS6, PS7 e PS8; e o grupo 3 (G3) incluindo PS10 e PS11, respectivamente.

No dendrograma HCA, a menor distância entre duas amostras indicou sua maior similaridade e as amostras agrupadas no mesmo grupo foram as mais similares. Dessa forma, é possível observar a maior semelhança entre as amostras PS1 e PS12, seguido de PS4. A amostra PS9 apresenta maior distância para o cluster formado, esta diferença pode estar associada ao seu maior conteúdo flavonoídico em relação às demais. Também é possível, observar a similaridade entre PS2, PS3, seguido de PS5. Esta última, apresenta maior distância em relação às primeiras, que pode estar associada às diferenças

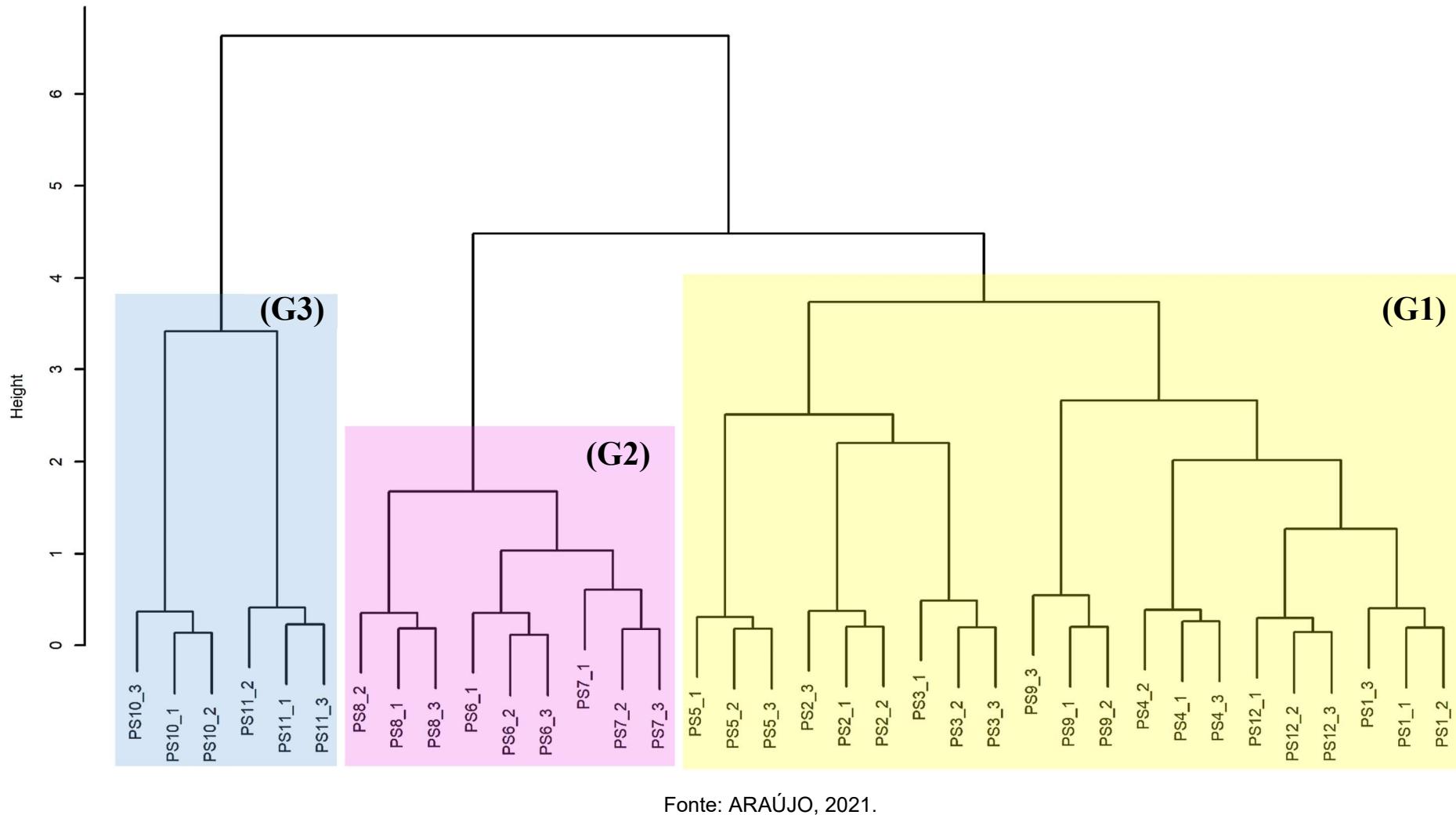
devido ao maior conteúdo flavonoídico e menor teor de compostos fenólicos quando comparados aos valores obtidos em PS2 e PS3.

Os resultados observados para o G2, demonstram a similaridade entre PS6 e PS7, seguido por PS8. O agrupamento das amostras pode estar associado aos menores teores dos marcadores avaliados ao longo do ano.

O grupo G3 apresenta variância significativa entre os seus componentes PS10 e PS11, que pode ser observada pela maior distância entre as amostras. Estes resultados podem estar associados aos maiores teores de marcadores observados nestes meses. Com destaque para PS10 que apresentou maior teor de EPG e CAT, enquanto PS11 exibiu maiores teores de EPI, flavonoides totais e compostos fenólicos entre todos os meses avaliados.

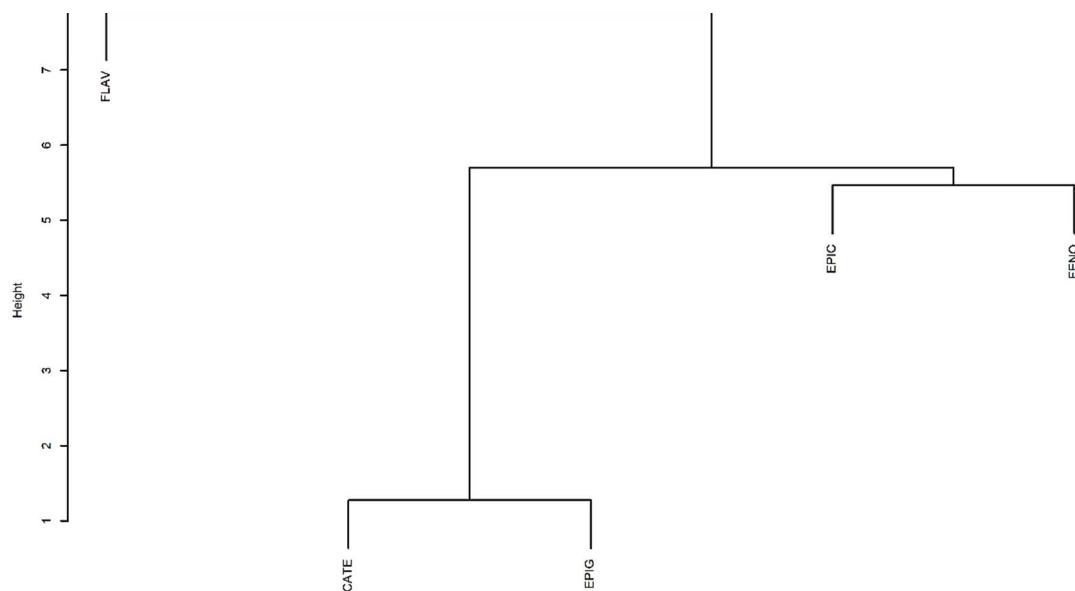
No geral, os resultados observados na análise de HCA foram semelhantes aos verificados anteriormente pelo PCA, confirmando que o HCA pode classificar a similaridade entre as amostras de *M. obtusifolia* coletadas em diferentes épocas do ano. No tocante às diferenças observadas para a classificação dos grupos, foi possível verificar a influência sazonal na composição química das amostras avaliadas.

Figura 48. Dendograma de três composições químicas para 12 amostras de *M. obtusifolia*. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3.



A análise da técnica de agrupamento possibilitou a investigação acerca da relação existente entre os marcadores avaliados (EPG, CAT, EPI, Fenólicos Totais e Compostos fenólicos totais). Os resultados foram dispostos no dendrograma (Figura 49) que apresenta as distâncias existentes entre as variáveis analisadas.

Figura 49. Dendrograma das variáveis analisadas por HCA.



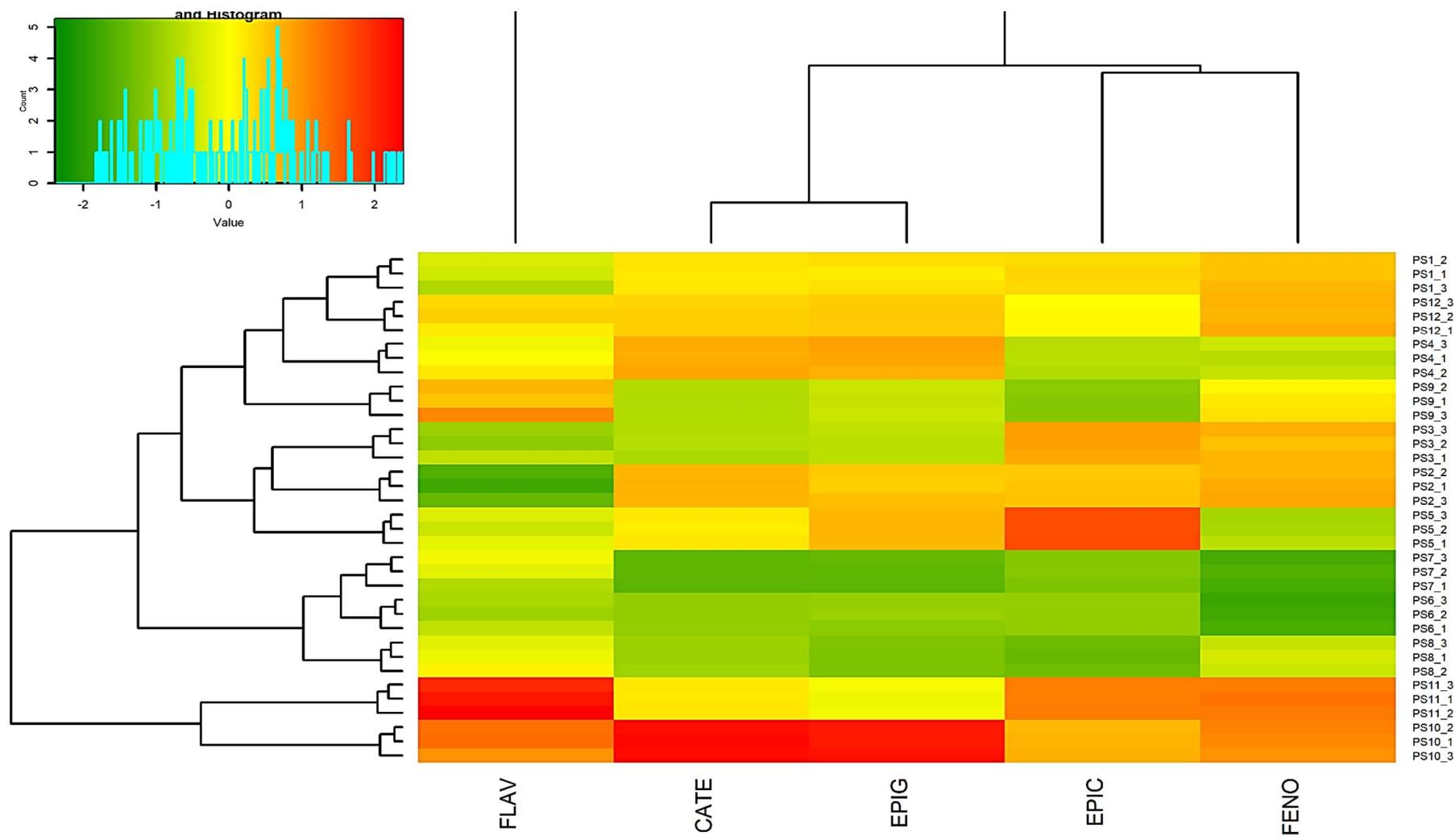
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Como uma forma de melhor compreender os efeitos sazonais sobre a composição química e nos conteúdos dos constituintes fenólicos das amostras avaliadas, foi realizada uma análise *heatmap* de *clusters* utilizando as 36 replicatas obtidas por HPLC-DAD (Figura 50).

Esse tipo de mapa de calor tem como objetivo construir associações entre os pontos de dados e seus recursos. É possível avaliar quais indivíduos são semelhantes ou diferentes uns dos outros, com um objetivo semelhante para as variáveis. As ferramentas de análise que constroem esse tipo de mapa de calor geralmente implementam o *clustering* como parte de seu processo. São comumente usados em análises de amostras biológicas e campos relacionados para revelar clusters hierárquicos em matrizes de dados. Essa técnica de visualização tem alta densidade de dados e revela clusters melhor do que mapas de calor não ordenados sozinhos (ENGLE *et al.*, 2017).

A cor vermelha e seus tons representam a maior intensidade e presença dos compostos em análise, enquanto a cor verde corresponde aos menores teores detectados. Dessa forma, é possível observar a maior proporção de marcadores e compostos fenólicos entre as amostras PS10 e PS11, enquanto os menores valores observados correspondem a PS6, PS7 e PS8. As demais amostras apresentam composição intermediária e variada a depender da amostra analisada que compõem o G1 do HCA.

Figura 50. *Heatmap* com a variação dos marcadores e perfil fenólico (qualitativo e quantitativo) dos extratos obtidos a partir das folhas de *M. obtusifolia* entre os meses de Janeiro a Dezembro de 2017.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.8 Doseamento de flavan-3-óis em extratos de *M. rigida*

A quantificação de marcadores existentes em extratos de origem vegetal deve ser realizada com o auxílio de uma curva de calibração que pode ser obtida de acordo com a faixa linear de trabalho. A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (RIBANI *et al.*, 2004). Entretanto, este intervalo também pode representar a variabilidade dos dados (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Conjuntos de dados com um grande intervalo apresentam grande variabilidade, enquanto conjuntos de dados com intervalos menores têm pequena variabilidade. Como o intervalo não considera todas as pontuações na distribuição, geralmente não fornece uma descrição precisa da variabilidade de toda a distribuição. Dessa forma, a menor variabilidade é melhor, visto que representa medições e análises mais precisas (INDRAYANTO, 2018; MARSON *et al.*, 2020).

Ao avaliar os teores dos marcadores em estudo nos extratos etanólicos obtidos de *M. rigida*, foi possível verificar a presença de valores inferiores aos estabelecidos na curva de calibração construída na linearidade da validação de metodologia analítica. Portanto, optou-se por realizar a construção de novas curvas de calibração para os marcadores, reduzindo os desvios e aumentando a sensibilidade de quantificação das moléculas. Os detalhes e resultados obtidos para a construção das curvas, bem como a avaliação do efeito matriz e os limites de detecção e quantificação estão descritos detalhadamente no Apêndice C.

Os resultados foram obtidos através das novas curvas de calibração para EPG ($y = 2806,1x - 1430,7$), CAT ($y = 7401x + 757,07$) e EPI ($y = 17866x - 10646$) e estão apresentados na Tabela 88 e Gráfico 74, assim como os cromatogramas equivalentes aos extratos (Figuras 51 a 54) e os cromatogramas com adição dos marcadores (Figura 55).

Após análise dos dados, verificou-se que o conteúdo de EPG, CAT e EPI apresenta distribuição diversa entre as partes de *M. rigida*, destacando-se o extrato das folhas que evidenciou os maiores índices dos marcadores (6,34 – 21,71 µg/mg de extrato). Estes resultados refletem a importância desta classe de substâncias por seus efeitos antioxidantes e protetores frente à radiação UV

(SHI *et al.*, 2016). Enquanto os menores índices foram observados no extrato das cascas da raiz, em que não foi possível detectar a presença do marcador CAT. De acordo com Santos *et al.* (2021) as cascas da raiz de *M. ilicifolia* apresentam alta concentração de alcaloides do tipo sesquiterpeno piridínicos e triterpenos quinonametídeos, destacando a acumulação restrita e o alto teor de proteínas associadas à produção destes metabólitos em detrimento aos demais nesta região.

A presença destes compostos por toda a espécie pode resultar da resposta ao estresse hídrico. De acordo com GU *et al.*, 2020, ao avaliar a proteômica da espécie *C. sinensis*, foi possível observar o maior acúmulo destes compostos em indivíduos submetidos à escassez de água, resultando em uma maior tolerância. Ainda de acordo com os autores, proteínas que estão relacionadas à biossíntese da catequina, interagem mais fortemente em muitos dos principais processos metabólicos das plantas em resposta ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram observados por Cheruiyot *et al.* (2008), em que foi possível correlacionar a presença da epigalocatequina e epicatequina à maior resistência à escassez hídrica.

Os maiores teores relacionados ao marcador epicatequina foram observados nos extratos das folhas e caule, estes resultados podem estar associados à maior presença de taninos nestas regiões da planta, visto que o marcador corresponde ao precursor principal desta classe de metabólitos. Em estudo realizado por Neri (2016), utilizando a espécie *M. rigida*, foi possível observar teores consideráveis de taninos nas folhas e caule da espécie em estudo.

Os teores de catequina e epicatequina localizados nas raízes desta espécie podem indicar relação com a sua capacidade fitotóxica para controle de ambiente, inibindo o crescimento de outras espécies vegetais (INDERJIT; CALLAWAY; HOLBEN, 2008; BAIS; KAUSHIK, 2010; KAUSHIK *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados para a quantificação dos referidos marcadores na espécie correspondem ao primeiro relato na literatura, representando a primeira etapa para o processo de estabelecimento de parâmetros para padronização da espécie vegetal.

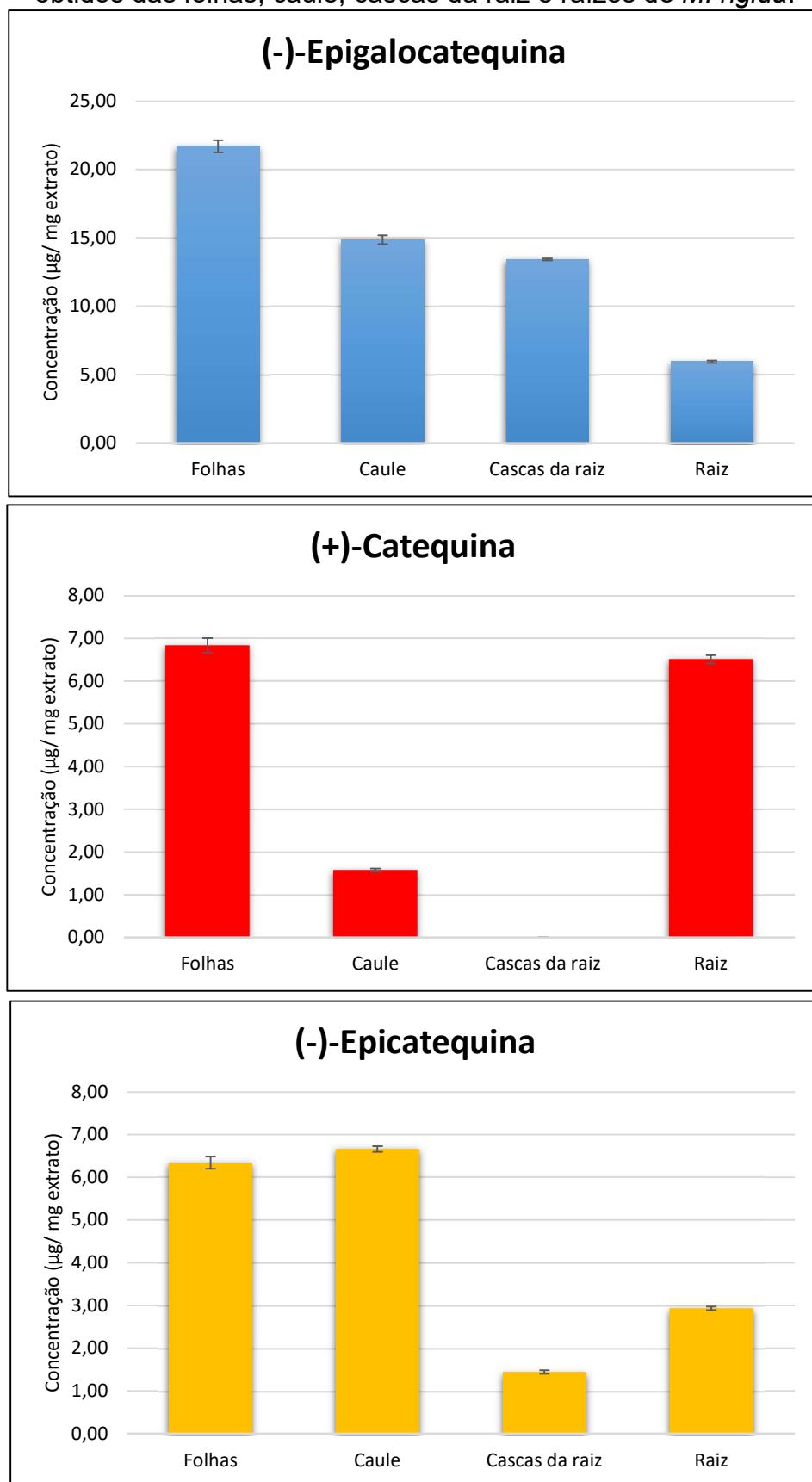
Tabela 89. Teores dos marcadores obtidos (n = 3) nos extratos etanólicos secos de *Monteverdia obtusifolia* Mart (EEB) obtidos a partir das coletas nos meses de janeiro a dezembro de 2017.

	Epigalo catequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPG)	Desvio Padrão (DP) (EPG)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Catequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (CAT)	Desvio Padrão (DP) (CAT)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)	Epicatequina (n=3) (μ g/mg de extrato)	Média (EPI)	Desvio Padrão (DP) (EPI)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Folhas	21,25				6,67				6,50			
	22,12	21,71	0,44	2,01	6,84	6,84	0,17	2,49	6,22	6,34	0,14	2,25
	21,75				7,01				6,31			
Caule	14,56				1,59				6,62			
	14,85	14,87	0,32	2,15	1,61	1,58	0,04	2,28	6,59	6,66	0,07	1,02
	15,20				1,54				6,69			
Casca da raiz	13,42								1,48			
	13,36	13,43	0,08	0,56	*	*	*	*	1,40	1,45	0,04	2,88
	13,51								1,46			
Raiz	6,02				6,62				2,97			
	5,86	5,95	0,08	1,38	6,43	6,51	0,10	1,49	2,89	2,94	0,04	1,41
	5,97				6,49				2,95			

Legenda: *Marcador não detectado.

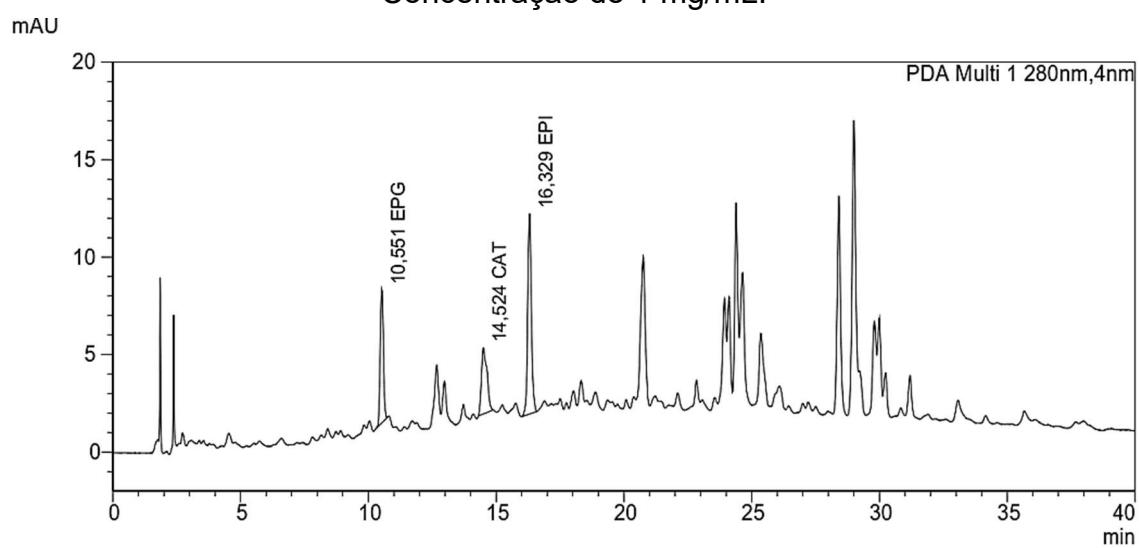
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico 74. Teores dos marcadores em extratos etanólicos obtidos das folhas, caule, cascas da raiz e raízes de *M. rigida*.



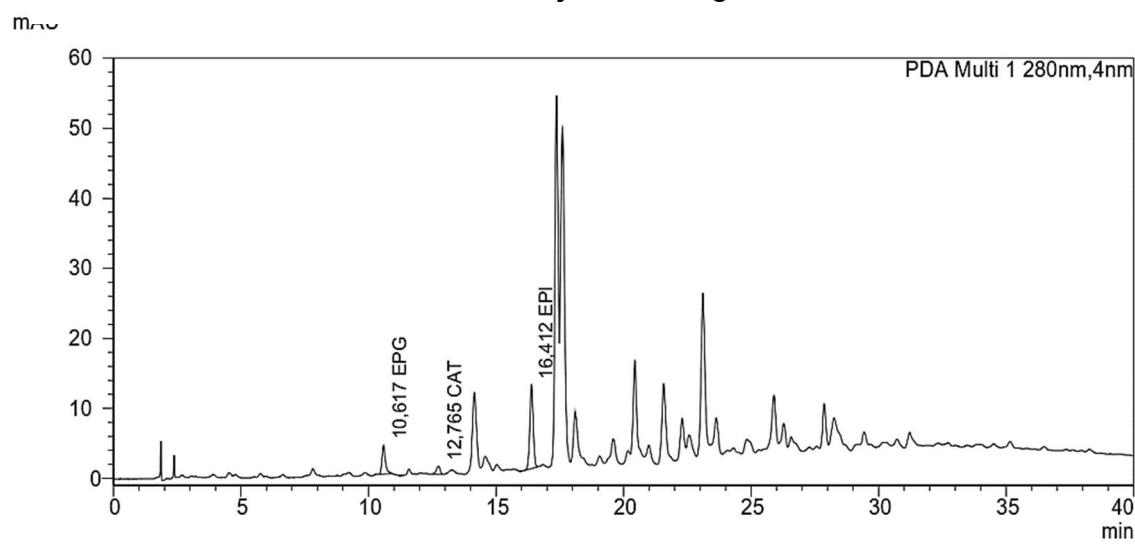
Legenda: (-)-Epigallocatequina (a), (+)-Catequina (b) e (-)-Epicatequina (c). Os valores são expressos em média \pm desvio padrão. Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 51. Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *M. rigida*.
Concentração de 1 mg/mL.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 52. Cromatograma do extrato etanólico do caule de *M. rigida*.
Concentração de 1 mg/mL.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 53. Cromatograma do extrato etanólico das cascas da raiz de *M. rigida*. Concentração de 1 mg/mL

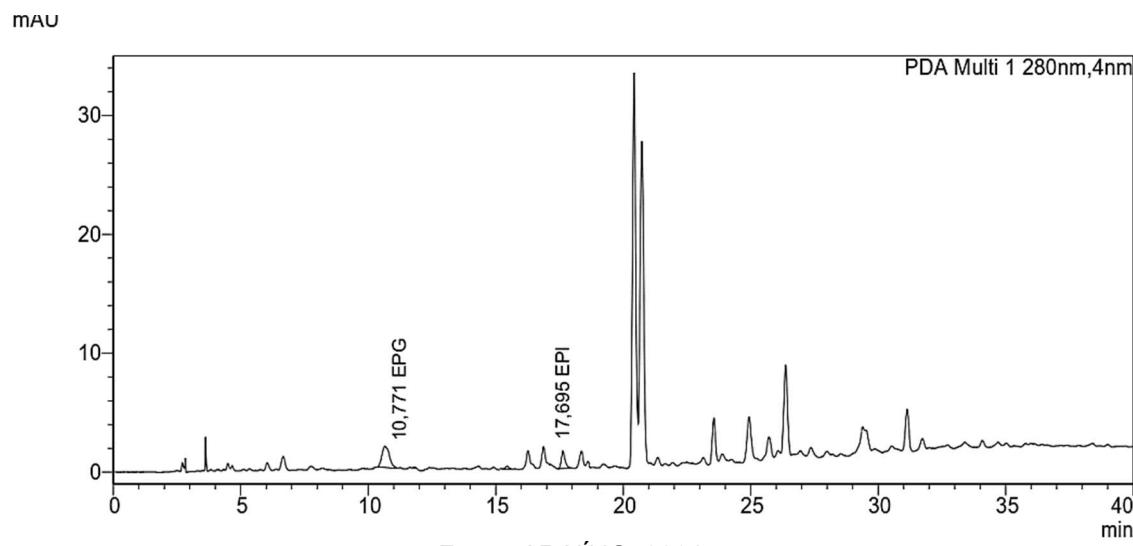


Figura 54. Cromatograma do extrato etanólico da raiz de *M. rigida*. Concentração de 1 mg/mL.

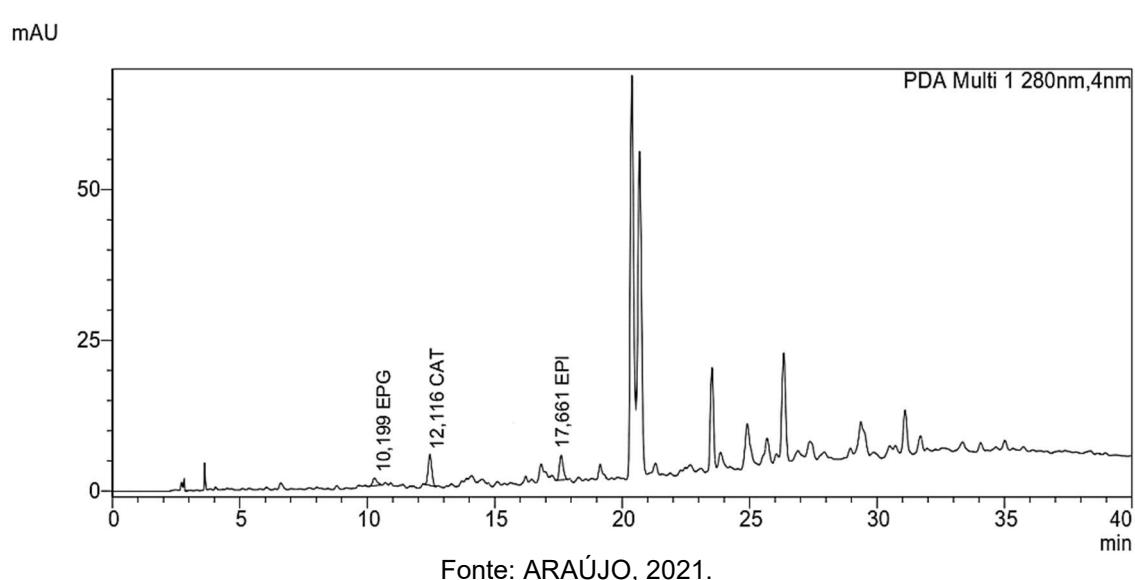
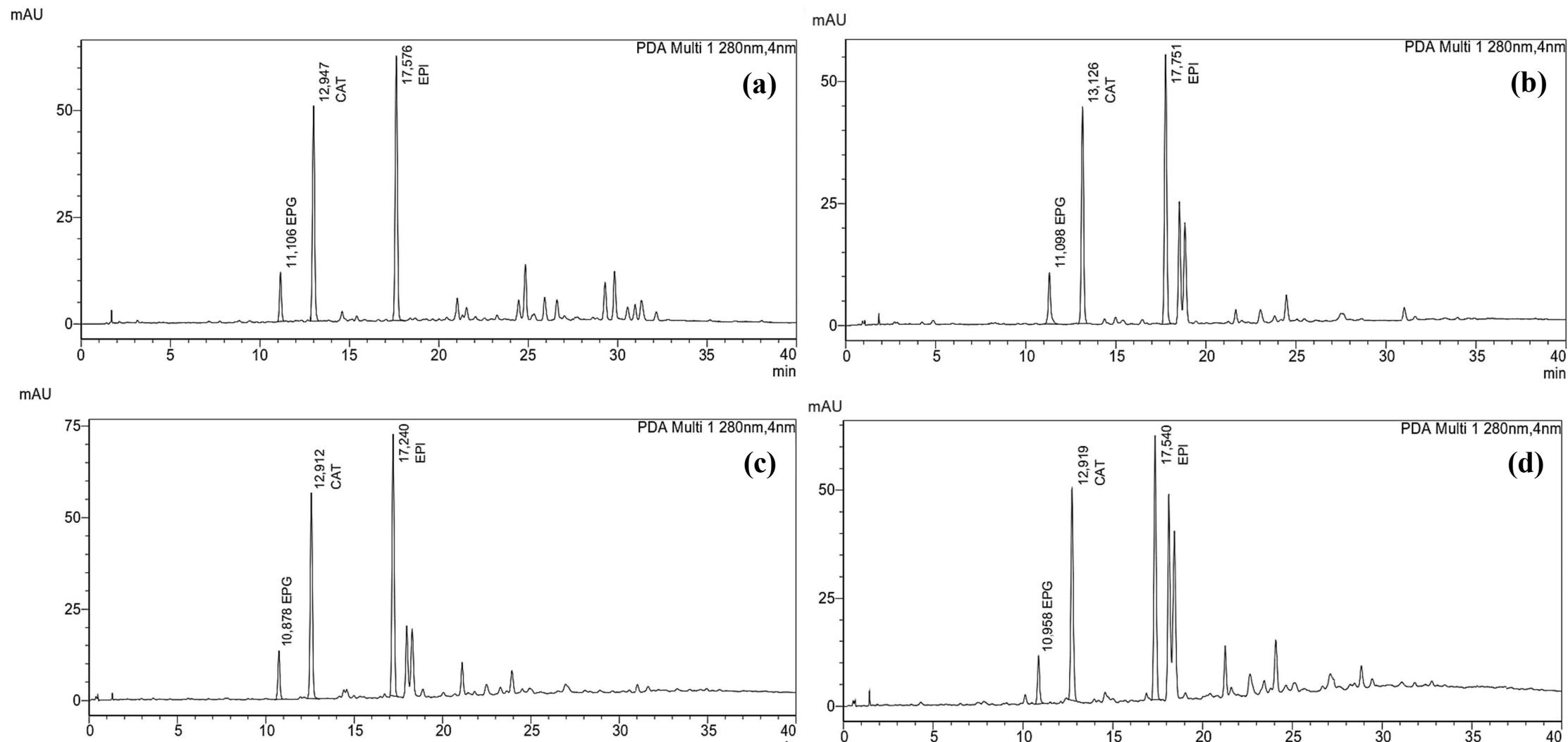


Figura 55. Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral (1 mg/mL), com adição dos padrões (-)-Epigalocatequina (EPG), (+)-Catequina (CAT) e (-)-Epicatequina (EPI).

30a



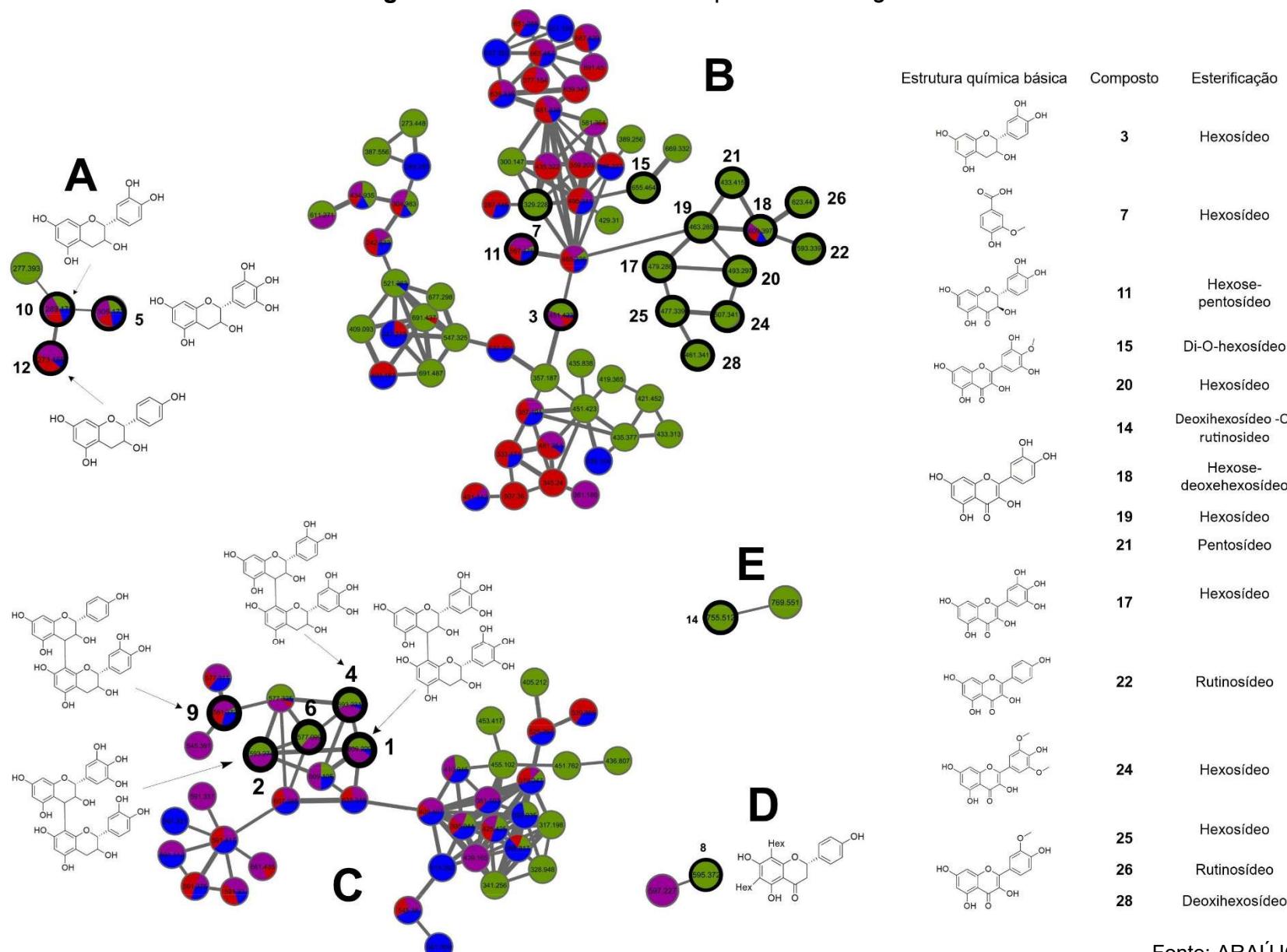
Legenda: (a) folhas, (b) casca da raiz, (c) caule e (d) raiz. Fonte: ARAÚJO, 2021.

5.9 Rede molecular e desreplicação da espécie *Monteverdia rigida* (Mart) Biral

A análise dos espectros EM² no modo negativo dos extratos etanólicos brutos das folhas (F), caule (C), cascas da raiz (CR) e cerne da raiz (R) de *M. rigida* na plataforma GNPS produziu uma rede molecular com 379 nodos e 39 *clusters* (nodos e *clusters* não relacionados às amostras foram excluídos). A comparação dos dados espectrais das amostras com as bibliotecas disponíveis no GNPS exibiu 43 anotações. Após avaliação do perfil de fragmentação das substâncias anotadas com a literatura, 28 compostos foram tentativamente identificados (Tabela 89). As substâncias que foram desreplicadas e estão localizadas em *clusters* com dois ou mais nodos estão representados na figura 56.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar 5 *clusters* principais (Figura 56). No *cluster A* observou-se a presença de flava-3-óis, o *cluster B* apresentou majoritariamente flavonoides O-glicosilados (flavanol, flavanonol e flavan-3-ol), o *cluster C* exibiu a presença de procianidinas diméricas do tipo B, o *cluster D* apresentou flavanona C-glicosilada e no *cluster E* foi observado flavonol com 3 unidades de açúcar.

O *cluster A*, apresentou três nodos com *m/z* 273, 289 e 305 [M-H]⁻, com tempos de retenção em 41.7, 37.1 e 29.7 minutos, correspondentes aos picos 12, 10 e 5 no cromatograma de pico base (Figura 56). Os perfis de fragmentação destes compostos, de acordo com a literatura, estão relacionados aos flava-3-óis, sendo a diferença visualizada entre os nodos de 16 Da, correspondente a unidades de (-OH) no anel B, esta similaridade estrutural refletiu no valor de cosseno entre nodos, que foi maior que 8,5. Desta forma, os compostos 5, 10 e 12 foram tentativamente identificados como (epi)gallocatequina, (epi)catequina e (epi)afzelequina, respectivamente (ROCKENBACH *et al.*, 2012; MENA *et al.*, 2018; COSTA SILVA *et al.*, 2019). A rede molecular e análise dos espectros de massas permitiram verificar a presença dos compostos (epi)catequina e (epi)gallocatequina em todas as partes da planta (F, C, CR e R), enquanto a (epi)afzelequina (C, CR e R) não foi observada para o extrato equivalente às folhas da espécie (figura 56 e 57).

Figura 56. Rede molecular das partes de *M. rigida*.

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A forma ao redor do nodo indica que este foi desreplicado. As partes da espécie *M. rigida* são representada pela cor verde (F), roxo (C), vermelho (R) e azul (CR). As intensidades das linhas entre os nodos foram relacionadas aos valores de cosseno, indicando quanto maior a espessura, maior o grau de similaridade entre os nodos.

O cluster **B** apresentou nodos contendo características diferentes em relação à distribuição dos extratos avaliados. Os íons precursores com *m/z* 451, 597 e 609 correspondentes aos picos 3, 11 e 18, encontram-se distribuídos em todas as partes da planta (F, C, CR e R) (Figuras 56 e 57). Ao avaliar a similaridade espectral entre os dados da plataforma e os experimentais em comparação com os dados da literatura (tabela 90), foi possível observar a perda de unidades de hexose (162 Da) e pentose (132 (Da), com a análise do perfil de fragmentação das agliconas, foi possível sugerir a presença dos compostos (epi)catequina-O-hexosídeo (3), taxifolina-O-hexose-pentosídeo (11) e rutina (18) (ZHAO *et al.*, 2013; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2015; WANG *et al.* 2015; KANG *et al.*, 2016).

A riqueza de compostos fenólicos do extrato das folhas de *M. rigida* em comparação às outras partes analisadas (C, CR, R) foi demonstrada no cluster **B**. Foram observadas nas folhas, a presença de compostos fenólicos simples como o ácido vanilíco-O-hexosídeo (7), mas principalmente flavonóis, como a quercetina e seus derivados (18, 19, 21), miricetina-3-O-hexosídeo (17) e o Kaempferol-3-O-rutinosídeo (22), assim como, flavonóis metoxilados no anel C, mearnsetina-di-O-hexosídeo (15), mearnsetina-O-hexosídeo (20), siringetina-3-O-hexosídeo e isoramnetina e seus derivados (25, 26, 28) (FABRE *et al.*, 2001; JUSTESEN *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2008; CELLI *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2011; MENA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018; HONG *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019; QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2020; SUKOVIC *et al.*, 2020).

O cluster **C** exibiu nodos que apresentavam fragmentações características de procianidinas, com a presença de íons fragmentos correlacionados a fissão heterocíclica do anel B, Retro Diels-Alder e principalmente a fissão quinonametídeo, permitindo propor a presença dos compostos (epi)gallocatequina→(epi) gallocatequina (1), (epi)gallocatequina→(epi)catequina (2), (epi)afzelequina→(epi)catequina (9) e procianidina tipo B dímero (6) (FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; SOUZA *et al.*, 2008; DEL BUBBA *et al.*, 2012; FRAIGE *et al.*, 2018; ESCOBAR-AVELLO *et al.*, 2019). O composto 9 foi observado em todos os extratos analisados (F, C, CR, R), enquanto as substâncias 1, 2 e 4 estavam presentes

na F, C e CR, e o composto 6 apenas em F e C, demonstrando a diversidade da disposição das procianidinas na espécie *M. rigida*.

Tabela 90. Caracterização dos compostos fenólicos presentes na folha (F), caule (C), raiz (R) e casca do caule (CR) de *M. rigida* por CLAE-IES-EMn.

Pico	T.R	[M-H] ⁻	EM ⁿ m/z	Assignment	Parte da Planta	Referências
1	18,0	609	MS ² [609]: 483, 441, 423, 305	(epi)gallocatequina→(epi)gallocatequina	F, C, CR	FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENZA, 2000; ESCOBAR-AVELLO <i>et al.</i> , 2019
2	23,6	593	MS ² [593]: 467, 425, 407, 303, 289	(epi)gallocatequina →(epi)catequina	F, C, CR	FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENZA, 2000; ESCOBAR-AVELLO <i>et al.</i> , 2019
3	25,4	451	MS ² [451]: 289 MS ³ [451→289]: 245, 205, 179	(epi)catequina-O- hexosídeo	F, R, CR, C	ZHAO <i>et al.</i> 2013; KANG <i>et al.</i> , 2016
4	26,2	593	MS ² [593]: 467, 441, 423, 305, 287	(epi)catequina→(epi)gallocatequina	F, C, CR	FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENZA, 2000; ESCOBAR-AVELLO <i>et al.</i> , 2019
5	29,7	305	MS ² [305]: 221, 219, 179 MS ³ [305→179]: 164, 151, 137	(epi)gallocatequina	F, R, CR, C	MENA <i>et al.</i> , 2012
6	31,0	577	MS ² [577]: 559, 451, 425, 407, 289 MS ³ [577→425]: 407	Procionidina tipo B dimero	F, C	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018

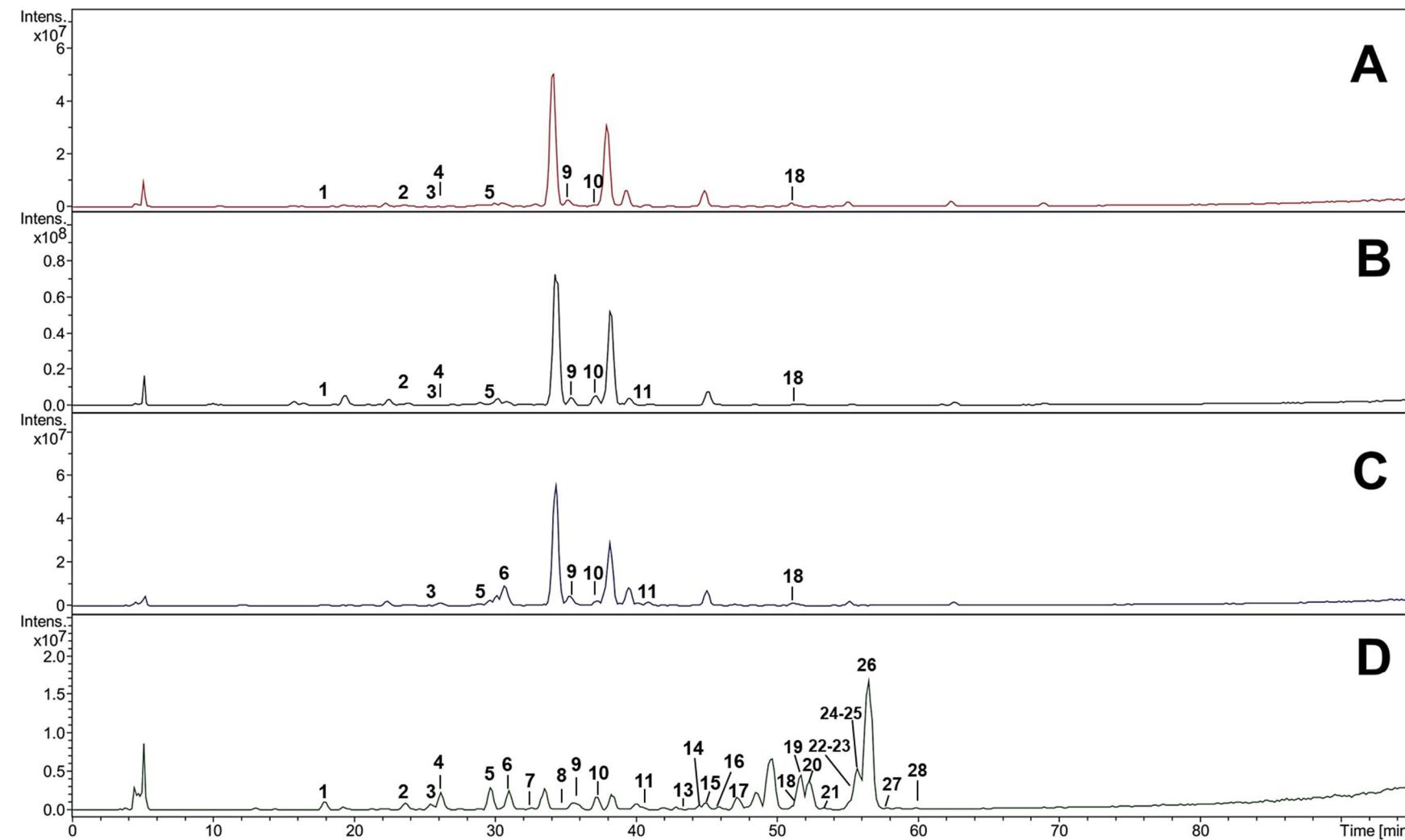
7	32,5	329	MS ² [329]: 167 MS ³ [329→167]: 151, 123	Ácido vanilíco-O-hexosídeo	F	MENA <i>et al.</i> , 2012
8	34,7	595	MS ² [595]: 505, 475, 415, 385, 355 MS ³ [595→355]: 235, 209, 167	Naringenina-6,8-di-C-hexosídeo	F	QIAO <i>et al.</i> , 2011; LI <i>et al.</i> , 2016
9	35,2	561	MS ² [561]: 435, 407, 289 MS ³ [561→289]: 245, 205, 179	(epi)afzelequina- (epi)catequina	F, R, CR, C	SOUZA <i>et al.</i> , 2008; DEL BUBBA <i>et al.</i> , 2012
10	37,1	289	MS ² [289]: 245, 205, 203, 179 MS ³ [289→245]: 203, 227, 187, 161, 175	(epi)catequina	F, R, CR, C	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 2012
11	40,6	597	MS ² [597]: 465, 303 MS ³ [597→303]: 285, 259, 217, 125	Taxifolina-O-hexose-pentosídeo	F, R, CR, C	KANG <i>et al.</i> , 2016
12	41,7	273	MS ² [273]: 255, 229, 187, 137	(epi)afzelequina	R, CR, C	COSTA SILVA <i>et al.</i> , 2019
13	43,8	625	MS ² [625]: 463, 300, 301 MS ³ [625→463]: 301, 179 MS ³ [625→300]: 272, 256, 179, 151	Quercetina-di-O-hexosídeo	F	LLORENT-MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2016; PIANOSKI <i>et al.</i> , 2020
14	44,4	755	MS ² [755]: 609, 300, 301 MS ³ [755→300]: 271, 272, 256, 179, 151	Quercetina-O-deoxihexosídeo-O-rutinosídeo	F	GOUVEIA; CASTILHO, 2010; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2018
15	44,8	655	MS ² [655]: 493, 331, 316 MS ³ [655→493]: 331, 316, 315, 287, 243 MS ³ [655→331]: 316, 315	Mearnsetina-di-O-hexosídeo	F	HAN <i>et al.</i> , 2008; HONG <i>et al.</i> , 2019

16	45,8	639	MS ² [639]: 477, 315, 314 MS ³ [639→477]: 315, 271, 151 MS ³ [639→315]: 300, 271, 151	Isoramnetina-di-O-hexosídeo	F	PEREIRA <i>et al.</i> , 2016; NEGRI <i>et al.</i> , 2018
17	47,1	479	MS ² [479]: 317, 316 MS ³ [479→316]: 287, 271, 179, 151	Miricetina-3-O-hexosídeo	F	CELLI <i>et al.</i> , 2011
18	51,3	609	MS ² [609]: 301 MS ³ [609→301]: 273, 257, 229, 179, 151	Rutina	F, R, CR, C	SIMIRGIOTIS <i>et al.</i> , 2015; WANG <i>et al.</i> , 2015
19	51,7	463	MS ² [463]: 343, 301 MS ³ [463→301]: 273, 257, 229, 179, 151	Quercetina-3-O-hexosídeo	F	WANG <i>et al.</i> , 2015
20	52,1	493	MS ² [493]: 331, 316 MS ³ [493→331]: 316, 315, 287, 271, 243, 179, 151 MS ³ [493→316]: 287, 271, 243, 179, 151	Mearnsetina-O-hexosídeo	F	SANTOS <i>et al.</i> , 2012
21	53,3	433	MS ² [433]: 301 MS ³ [433→301]: 273, 257, 179, 151	Quercetina-3-O-pentosídeo	F	WANG <i>et al.</i> , 2015
22	55,0	593	MS ² [593]: 447, 285 MS ³ [593→285]: 257, 243, 241, 229, 213, 199, 151	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	F	FABRE <i>et al.</i> , 2001; ZHOU <i>et al.</i> , 2018
23	55,4	447	MS ² [447]: 301 MS ³ [447→301]: 179, 151	Quercetina-O-deoxihexosídeo	F	PASCALE <i>et al.</i> , 2020
24	55,7	507	MS ² [507]: 345, 344 MS ³ [507→344]: 330, 316, 301, 287, 273, 151	Siringetina-3-O-hexosídeo	F	SUN <i>et al.</i> , 2017; ŠUKOVIC <i>et al.</i> , 2020

25	55,9	477	MS ² [477]: 315, 314, 300, 271, 243 MS ³ [477→314]: 300, 271, 243, 151	isoramnetina-3-O-hexosídeo	F	GU <i>et al.</i> , 2011
26	56,5	623	MS ² [623]: 477, 315, 300 MS ³ [623→315]: 300, 271, 272, 255, 151	isoramnetina-3-O-rutinosídeo	F	GU <i>et al.</i> , 2011; WANG <i>et al.</i> , 2015; ZHENG <i>et al.</i> , 2019
27	57,7	447	MS ² [447]: 315, 314 MS ³ [447→314]: 300, 271, 243, 151	isoramnetina-3-O-pentosídeo	F	SANTOS <i>et al.</i> , 2012
28	59,8	461	MS ² [461]: 315, 314 MS ³ [461→314]: 300, 285, 271, 243, 151	isoramnetina-O-deoxihexosídeo	F	JUSTESEN, 2001; QUINTANS-JUNIOR <i>et al.</i> , 2020

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Figura 57. Cromatograma do pico base da raiz (A), casca da raiz (B), caule (C) e folhas (D) da espécie de *M. rigida*.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

O cluster **D** exibiu nodo com m/z 595 (8) e tempo de retenção em 34,7 minutos, presente apenas no extrato obtido a partir das folhas da *M. rigida* (figura 56 e 57). Ao avaliar o perfil de fragmentação deste composto com a literatura, foi possível propor a flavanona naringenina-6-8-di-C-hexosídeo (QIAO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2016).

O cluster **E** apresentou o íon precursor com m/z 755, com tempo de retenção em 44,4 minutos, correspondente ao pico 14 (figura 57). O espectro de EM² indicou a perda de uma unidade de deoxihexose (146 Da) através do íon fragmento com m/z 609, e a presença do íon fragmento correspondente a aglicona (m/z 301) indicou também a perda de uma unidade rutinosídeo (308 Da), o perfil de fragmentação da aglicona (Tabela 90), permitiu propor para o composto 14 o flavonol quercetina-O-deoxihexosídeo-O-rutinosídeo, substância presente exclusivamente nas folhas da espécie *M. rigida* (LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2016; PIANOSKI *et al.*, 2020).

Nas folhas de *M. rigida* também foram tentativamente identificados os flavonóis quercetina-di-O-hexosídeo (13), quercetina-O-deoxihexosídeo (23) e isoramnetina-di-O-hexosídeo (16), isoramnetina-3-O-pentosídeo (27) (Tabela 90) (GOUVEIA; CASTILHO, 2010; SANTOS *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2016; NEGRI *et al.*, 2018; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2018; PASCALE *et al.*, 2020).

A análise por CLAE-EMⁿ e rede molecular dos extratos da F, C, CR e R de *M. rigida* confirmam a riqueza de fenólicos da espécie, com a presença de flavonol, flavan-3-ol, flavanonas, flavanonol, ácido fenólicos e procianidinas. Dos 28 compostos propostos neste trabalho para *M. rigida*, 27 estão sendo reportados pela primeira vez na espécie. Demonstrando a importância da análise do perfil químico de espécies vegetais por técnicas atuais, principalmente, devido as moléculas estarem relacionadas ao potencial farmacológico desta espécie, cujo uso popular está pautado no tratamento de úlceras, gastrites, infecções e inflamações (ANDRADE-LIMA, 1989; ALMEIDA *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007).

A rede molecular permitiu visualizar uma diferença significativa do conteúdo fenólico dos extratos C, CR e R, em comparação com o extrato das folhas, há uma presença tanto majoritária como exclusiva de vários fenólicos nas folhas de *M. rigida*, enquanto nos extratos C, CR e R compostos fenólicos são

minoritários. Estes resultados concordam com os achados de Santos *et al.* (2021), que ao avaliarem a proteômica de *M. ilicifolia*, verificaram diferenças na composição enzimática das cascas da raiz e raízes em relação às folhas. De acordo com os autores, as partes lenhosas da espécie apresentam maior quantidade de enzimas relacionadas à produção de terpenoides e alcaloides, como os triterpenos quinonametídeos, e alcaloides do tipo sesquiterpeno piridínicos principalmente. Desta forma, a análise dos extratos C, CR e R por CLAE-EMⁿ no modo positivo pode fornecer um melhor perfil químico destas partes, devido a melhor visualização de terpenos e alcaloides.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As análises de controle de qualidade realizadas com os materiais vegetais de *Monteverdia obtusifolia* Mart. e *Monteverdia rigida* estabeleceram um perfil mais adequado para a caracterização das drogas em estudo. Foram determinadas especificações para os métodos de análise de material vegetal presentes na Farmacopeia Brasileira 6^a edição: “determinação de água em drogas vegetais”, “ensaio limite de metais pesados”, “determinação de cinzas totais e sulfatadas”, “granulometria de pós” e “determinação de densidade aparente de sólidos”.

Os ensaios de “determinação de água em drogas vegetais”, demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os meses de Junho, Julho e Agosto, estes valores podem estar associados ao maior índice de umidade observado no ano. Os demais ensaios como “granulometria de pós”, “cinzas totais e sulfatadas”, “determinação de densidade aparente” e “ensaio limite de metais pesados” não apresentaram variação sazonal e mantiveram os resultados estáveis ao longo do ano.

A avaliação do processo de extração, permitiu a obtenção de melhores índices de marcadores quando adotados os tamanhos de partícula > 600 µm e < 1200 µm associados à agitação.

Os ensaios de flavonoides totais e compostos fenólicos totais, determinados por métodos espectrofotométricos, foram validados e os extratos EEB e EEBq, bem como os obtidos das partes de *M. rigida* (F, C, CR e R) confirmaram a riqueza do conteúdo polifenólico presente nos extratos das espécies avaliadas. Os dados obtidos através das técnicas citadas, após análise estatística, revelaram ser influenciados por fatores sazonais e variaram ao longo do ano para a espécie *M. obtusifolia*. Em que os valores máximos obtidos para o doseamento de flavonoides totais e compostos fenólicos totais foram observados a partir do mês de outubro e atingiram o valor máximo ao fim do mês de novembro, sendo este período o mais adequado para a colheita da espécie.

O método analítico desenvolvido e validado previamente, foi submetido à validação parcial para os marcadores (-)-Epigalocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina e apresentou especificidade, linearidade, precisão, precisão intermediária e exatidão de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA no “Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (RDC 166/2017).

Também foi possível observar que os marcadores não sofreram interferência no seu doseamento por efeito matriz nos extratos de ambas as espécies. Ainda foi possível estabelecer os limites de detecção e quantificação para os flavan-3-óis nos diferentes extratos avaliados.

A avaliação dos extratos produzidos durante o estudo evidenciaram a influência de fatores sazonais na composição química sendo possível observar diferenças estatísticas significativas (95%) no conteúdo da (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e da (-)-Epicatequina entre os meses do ano. Entretanto, ao avaliar o tratamento aos quais os materiais vegetais foram submetidos (secagem em estufa e *quenching*), não foram observadas diferenças estatísticas entre os teores dos marcadores, destacando a eficiência da metodologia tradicional utilizando a estufa a 40º C.

As ferramentas de análise multivariadas PCA e HCA confirmaram as diferenças observadas entre os extratos e as influências dos fatores sazonais. Foi possível estabelecer as semelhanças e diferenças entre os extratos de *M. obtusifolia* de acordo com a influência de fatores abióticos como radiação, pluviometria, temperatura e umidade.

As análises realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, possibilitaram a determinação de um perfil químico mais adequado para as espécies. O uso da ferramenta de rede molecular permitiu verificar a diferença existente entre os conteúdos dos extratos F, C, CR e R de *M. rigida*, onde foi possível observar abundante conteúdo polifenólico na composição das folhas, enquanto triterpenos e alcaloides compõem majoritariamente o caule, cascas da raiz e raízes.

O processo de desreplicação dos extratos de *M. rigida* permitiram a anotação de 28 compostos, entre os quais 27 são reportados pela primeira vez na espécie. Para *M. obtusifolia*, foram observadas 25 anotações, com 21 relatos inéditos na espécie.

O presente estudo ressalta a importância do desenvolvimento e validação de métodos para quantificação e controle de qualidade de drogas e extratos vegetais e fitomedicamentos. Além disso, busca incentivar a realização de mais estudos nessa linha de pesquisa, uma vez que o aproveitamento da rica biodiversidade brasileira implicará em grandes benefícios para sociedade no surgimento de novos fitoterápicos e novas possibilidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU-NARANJO, R.; ARTEAGA-CRESPO, Y.; BRAVO-SANCHEZ, L.R.; PÉREZ-QUINTANA, M. L.; GARCÍA-QUINTANA, Y. Response surface methodology for optimisation of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from *Maytenus macrocarpa* bark by means of ultrasound-assisted extraction. **Wood Sci Technol.**, v. 52, p. 1359–1376, 2018. DOI: 10.1007/s00226-018-1034-x.
- ACHAKZAI, A. K. K.; ACHAKZAI, P.; MASOOD, A.; KAYANI, S. A.; TAREEN, R. B. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 2129–2135, 2009.
- ACOSTA-DACAL, A.; RIAL-BERRIEL, C.; DÍAZ-DÍAZ, R.; SUÁREZ, M. D. M. B.; ZUMBADO, M.; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A.; LUZARDO, O. P. Supporting dataset on the optimization and validation of a QuEChERS-based method for the determination of 218 pesticide residues in clay loam soil. **Data in Brief**, v. 33, 2020. DOI: 10.1016/j.dib.2020.106393.
- ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAYA, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Role of the COX-independent pathways in the ulcer-healing action of epigallocatechin gallate. **Food Funct.**, v. 2, n. 6, 338-347, 2011a. DOI: 10.1039/C0FO00183J.
- ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAYA, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 2, p. 527-536, 2011b. DOI: 10.1016/S1734-1140(11)70519-9.
- ADHIKARI, P.; JOSHI, K.; SINGH, M.; PANDEY, A. Influence of altitude on secondary metabolites, antioxidants, and antimicrobial activities of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*). **Plant Biosystems**, 2020. DOI: 10.1080/11263504.2020.1845845.
- AESA - Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. João Pessoa, 2017. Disponível em: http://www.aesa.pb.gov.br/aesa-website/meteorologia-chuvas-grafico/?id_municipio=174&date_chart=2017-12-31&period=year. Acesso: 03/01/2018
- AESA - Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. João Pessoa, 2018. Disponível em: http://www.aesa.pb.gov.br/aesa-website/meteorologia-chuvas-grafico/?id_municipio=31&date_chart=2018-12-31&period=year. Acesso: 12/11/2018
- AGATI, G.; BRUNETTI, C.; FINI, A.; GORI, A.; GUIDI, L.; LANDI, M.; SEBASTIANI, F.; TATTINI, M. Are Flavonoids Effective Antioxidants in Plants? Twenty Years of Our Investigation. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, 1098, 2020. DOI: 10.3390/antiox9111098.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114-40, 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000100021.

AHMED, A. S.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N., Evaluation of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus* species used in southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n. 100, p. 1-15, 2013.

AHMED, S.; STEPP, J. R.; ORIANS, C.; GRIFFIN, T.; MATYAS, C.; ROBBAT, A.; CASH, S.; XUE, D.; LONG, C.; UNACHUKWU, U.; BUCKLEY, S.; SMALL, D.; KENNELLY, E. Effects of Extreme Climate Events on Tea (*Camellia sinensis*) Functional Quality Validate Indigenous Farmer Knowledge and Sensory Preferences in Tropical China. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, a109126, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109126

AHPA - American Herbal Products Association Botanical. **Identity Reference Compendium**, 2021. Disponível em:
http://www.botanicalauthentication.org/index.php/Main_Page.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17613.

ALAERTS, G.; ERPS, J. V.; PIETERS, S.; DUMAREY, M.; VAN NEDDERKASSEL, A. M.; GOODARZI, M.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VAN DERHEYDEN, Y. Similarity analyses of chromatographic fingerprints as tools for identification and quality control of green tea. **Journal of Chromatography B**, v 910, p. 61-70, 2012. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.04.031.

ALAJMI, M. F. & ALAM, P., Anti-inflammatory activity and qualitative analysis of different extracts of *Maytenus obscura* (A. Rich.) Cuf. by high performance thin layer chromatography method. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 152-157, 2014.

ALAM, F.; SAQIB, Q. N. U. Pharmacognostic study and development of quality control parameters for fruit, bark and leaf of *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae). **Ancient science of life**, v. 34, n. 3, p. 147–155, 2015. DOI: 10.4103/0257-7941.157159.

ALEXOPOULOS, E. C. Introduction to multivariate regression analysis. **Hippokratia**, v. 14, Supl. 1, p. 23–28, 2010.

ALLARD, P.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317-3323, 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04804.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; SILVA, T.C.L.; AMORIM, E.L.C.; MAIA, M.B.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127–142, 2005. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2004.09.020.

ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 33, p. 239-307, 2006. DOI: 10.1016/S1572-5995(06)80029-3.

ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. P.; OZELA, E. F. O.; BARBOSA, W. L. R.; JUNIOR, J. O. C. S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.

ANDRADE, F. R. O.; SOUZA, A. A.; ARANTES, M. C. B.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas magistras. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p.38-44, 2005.

ANDRADE, S. F.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15 dioxo-21-hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 41-46, 2008.

ANDRADE, R. S.; ARAÚJO, D. I. A. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. 3β -friedelanol um triterpeno isolado de *Maytenus obtusifolia* Mart. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, VI edição., 2017, Juazeiro-BA. **Anais...** p. 24.

ANDRADE-LIMA, D. **Plantas das Caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989.

ANKOLEKAR, C.; JOHNSON, D.; PINTO, M. D. A. S.; JOHNSON, K.; LABBE, R.; SHETTY, K. Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria. **J Med Food**, v. 14, n. 11, p. 1321-1329, 2011. DOI: 10.1089/jmf.2010.0237.

ANTUNES, E. R. M.; DUARTE, R. S.; MORITZ, T.; SAWAYA, A. C. H. F. Differentiation of two *Maytenus* species and their hybrid via untargeted metabolomics. **Industrial Crops and Products**, v. 158, n. 113014, p. 1 – 9, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113014.

AOAC. **Appendix K: Guideline for Dietary Supplement and Botanical**, p. 1-32, 2013. Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf.

ARAÚJO, D. I. A. F. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade**

antioxidante e antimicrobiana do extrato de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae). 2015. 229p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

ARAÚJO, D. I. A. F.; FERNANDES, A. P. L. A.; ANDRADE, R. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. Quality control and quantitation of catechin and epicatechin from leaves of *Maytenus rigida* Mart. **MOL2NET 2018, International Conference on Multidisciplinary Sciences, 4th edition**, 2018. DOI: 10.3390/mol2net-04-05552.

ARAÚJO, D. I. A. F.; FERNANDES, A. P. L. A.; PINHEIRO, A. A. V.; SOUTO, A. L.; SALES, K. A.; ARAÚJO, P. R. A. F.; ANDRADE, R. S.; SILVA, M. S. Determination of flavan-3-ols by high-performance liquid chromatography-photodiode array, antioxidant potential, antimicrobial activity, and pharmacognostic evaluation of *Maytenus obtusifolia* (Mart.) leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 12, n. 3, p. 313-21, 2020. DOI: 10.4103/pr.pr_9_20.

ARDILES, A. E; GONZALES-RODRIGUEZ, A.; NUNEZ, M. J.; PERESTELO, N. R.; PARDO, V.; JIMENEZ, I. A. VALVERDE, A. M.; BAZZOCCHI, I. L. Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 diabetes mellitus. **Phytochemistry**, v. 84, p. 116-124, 2012. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.07.025.

ARMENGOL, G. F. **Biotic and abiotic factors that determine the emission of volatile organic compounds by flowers**. 2015. 153p. Tese (Doutorado em Fisiologia vegetal) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona-ESP.

ASHIHARA, H.; DENG, W. W.; MULLEN, W.; CROZIER, A., Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5–6, p. 559–566, 2010.

ARJUN, P.; VINCENT, S. G.; KANNAN, R. R. HPLC-PDA isolation and LC-MS/MS detection of an acetylcholinesterase inhibitory flavonoid from *Tephrosia purpurea* (L.) Pers. in zebrafish brain. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 53, p. 104-111, 2016.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; THE INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES TASKFORCE; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, p. 200–216, 2021. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.

AUGER, C.; MULLEN, W.; HARA, Y.; CROZIER, A. Bioavailability of polyphenon E flavan-3-ols in humans with an ileostomy. **J Nutr.**, v. 138, n. 3, p. 1535S-1542S, 2008. DOI:10.1093/jn/138.8.1535S.

AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSON, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-547, 2011.

AUSTEN, N. ; WALKER, H. J. ; LAKE, J. A. ; PHOENIX, G. K. ; CAMERON, D. D. The Regulation of Plant Secondary Metabolism in Response to Abiotic Stress: Interactions Between Heat Shock and Elevated CO₂. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, a1463, p. 1-12, 2019. DOI :10.3389/fpls.2019.01463.

BABENKO, L. M. ; SMIRNOV, O. E. ; ROMANENKO, K. O. ; TRUNOVA, O. K. ; KOSAKIVSKA, I. V. Phenolic compounds in Plants: biogenesis and functions. **Ukr. Biochem. J.**, v. 91, n. 3, 2019. DOI : 10.15407/ubj91.03.005.

BACCARIN, T.; FERREIRA, R. A.; GAZONI, V.; YUNES, R.; MALHEIROS, A.; LUCINDA-SILVA, R. M. Influence of Extraction Parameters on Hydroalcohol Extracts of the Stem Bark of *Rapanea ferruginea* Mez Using Myrsinoic Acid B as Marker. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 1113-1119, 2014. DOI: 10.4314/tjpr.v13i7.15.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIA-VELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 433–440, 2007.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MAYER, B.; DOS SANTOS, A. C.; TWARDOWSCHY, A.; POTRICH, F. B.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C.; MESIA-VELA, S. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. **J Ethnopharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 385-391, 2009. DOI: 10.1016/j.jep.2009.03.037.

BAIS, H. P.; KAUSHIK, S. Catechin secretion and phytotoxicity: Fact not fiction. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 5, p. 468–470, 2010. DOI: 10.4161/cib.3.5.12559

BALDISSEROTTO, A.; VERTUANI, S.; BINO, A.; DE LUCIA, D.; LAMPRONTI, I.; MILANI, R.; GAMBARI, R.; MANFREDINI, S. Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. **Bioorg Med Chem.**, v. 23, n. 1, p. 264-271, 2015. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.10.023.

BANSAL, A.; CHHABRA, V.; RAWAL, R. K.; SHARMA, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, p. 223–233, 2014. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.12.001.

BAPTISTA, R. F. M.; TAVEIRA, C. C. Assessment of quality of sample *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) traded in the Distrito Federal – Brazil. **Cenarium Pharmacêutico**, v. 4, n. 4, 2011.

BARNI, S. T.; CECHINEL- FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pescaprae* (L.) R.

Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BARTON, K. E.; KORICHEVA, J. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. **American Naturalist**, v. 175, p. 481–493, 2010. DOI: 10.1086/650722

BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R., Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2005.

BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, F1000 Faculty Rev-1554, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.7678.1.

BEGOU, O.; GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; WILSON, I. D. Quality Control and Validation Issues in LC-MS Metabolomics. In: THEODORIDIS, G.; GIKA, H.; WILSON, I. (eds) **Metabolic Profiling**. Methods in Molecular Biology, vol 1738. Humana Press, New York, NY, 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-7643-0_2.

BELOUFA, S.; HABTI, F.; BENHAR, S.; BELAFKIH, B.; TAYANE, S.; HAMDOUCH, S.; BENNAMARA, A.; ABOURRICHE, A.; Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. **Int J Metrol Qual Eng.**, v. 8, a9, 2017. DOI: 10.1051/ijmqe/2016030.

BELTRAME, F. L.; MAINARDES, R. B.; KHALIL, N. M.; PRESTES, R. A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; CASS, Q. B. A quantitative validated method using liquid chromatography and chemometric analysis for evaluation of raw material of *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 327-331, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000200018.

BENSOUSSAN, A.; LEE, S.; MURRAY, C.; BOURCHIER, S.; VAN DER KOOY, F.; PEARSON, J. L.; LIU, J.; CHANG, D.; KHOO, C. S. Choosing chemical markers for quality assurance of complex herbal medicines: Development and application of the herb MaRS criteria. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 97, n. 6, p. 628-640, 2015. DOI: 10.1002/cpt.100.

BETZ, J.M.; BROWN, P.N.; ROMAN, M.C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 44-52, 2011. DOI: 10.1016/j.fitote.2010.09.011.

BFG – The Brazil Flora Group. Growing knowledge: An overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085–1113, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411.

BHUSNURE, O. G.; SURYAWANSI, S.; VIJAYENDRA, S. S.; GHOLVE, S. B.; GIRAM, P. S.; BIRAJDAR, M. J. Standardization and Quality Evaluation of Herbal Drugs. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n.3-s, p. 1058-1063, 2019. DOI: 10.22270/jddt.v9i3-s.2941.

BIRAL, L.; SMIDT, E. C.; BOLSON, M.; LOMBARDI, J. A. A new species of *Maytenus* (Celastraceae) from the Brazilian Atlantic Forest, with evidence of molecular phylogeny, and two new synonyms for *Maytenus floribunda*. *Phytotaxa*, v. 231, n. 1, p. 53-62, 2015. DOI: 10.11646/phytotaxa.231.1.5.

BIRAL, L. **Sistemática e filogenia de *Maytenus* Molina (Celastraceae) na região neotropical**. 2016. 352p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

BIRAL, L.; SIMMONS, M. P.; SMIDT, E. C.; TEMBROCK, L. R.; BOLSON, M.; ARCHER, R. H.; LOMBARDI, J. A. Systematics of New World *Maytenus* (Celastraceae) and a New Delimitation of the Genus. *Syst. Bot.*, v. 42, p. 1-14, 2017. DOI:10.1600/036364417X696456.

BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. Celastraceae. *In: Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020a. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB605317>>. Acesso em: 18 mar. 2021

BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. Celastraceae. *In: Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB604679>>. Acesso em: 02 abr. 2021

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; ARAÚJO, M. B. D.; NUNES SALGADO, H. R. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 42, n. 1, p. 87–100, 2012.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A.; MENEZES JR, A.; FRANÇA, S. C., Influência da adubação mineral (NPK) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonoides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae)-Carqueja. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2001.

BORGES, D. B. **Comparação de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle de qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal**. 2005. 161p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning Metabolomics into Drug Discovery. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, n. 8, p. 1334-1338, 2016. DOI: 10.5935/0103-5053.20160083.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília-DF, 2003.

BRASIL, D. F. B. **Estudo fitoquímico e análise gastroprotetora dos principais constituintes das cascas das raízes de *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae).** 2013. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares, Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica.** Brasília-DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** Brasília-DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos,** Brasília-DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6 ed., vol. 1. Brasília-DF, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6 ed., vol. 2. Brasília-DF, 2019b.

BRASIL. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora>. Acesso em: 13/03/2021.

BRUNETTI, C.; FINI, A.; SEBASTIANI, F.; GORI, A.; TATTINI, M. Modulation of phytohormone signaling: A primary function of flavonoids in plant–environment interactions. **Front. Plant Sci.**, v. 9, 1042, p. 1-8, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01042.

BYSTROM, L. M.; LEWIS, B. A.; BROWN, D. L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R. L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1017 -1024, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.058.

CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. **Nat Prod Rep.**, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019. DOI: 10.1039/c9np00011a.

CALDAS-FILHO, M. R. D. **Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae).** 2013. 128p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

CALLIES, O.; NÚÑEZ, M. J.; PERESTELO, N. R.; REYES, C. P.; TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. Distinct sesquiterpene pyridine alkaloids from in Salvadoran and Peruvian Celastraceae species.

Phytochemistry, v. 142, p. 21-29, 2017.
DOI:10.1016/j.phytochem.2017.06.013.

CANSIAN, R. L.; KUBIAK, G. B.; BORSATTI, L.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; ROMAN, S. S.; PAROUL, N.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V.; MOSSI, A. J., Antioxidant and genotoxic properties of *Maytenus dasyclada*: a comparative study in relation to Maytenus reference species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 471-476, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.18113.

CAO, Y., LIANG, R.; YANG, B.; WANG, L.; YANG, Q.; WANG, Y. Protection of (-)-catechin gallate and (+)-epicatechin on xanthine-xanthine oxidase system injury in cultured cardiomyocytes. **Zhongguo Shiyan Fangjixue Zazhi**, v. 12, p. 36-38, 2006.

CAO, Y.; FANG, S.; FU, X.; SHANG, X.; YANG, W. Seasonal Variation in Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljin. **Forests**, v. 10, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/f10080624.

CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S.; MARQUES, L. M., Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000100008.

CARDOSO, N. Q. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir da *Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae)**. 2013. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

CARDOSO, I. C.; PEREIRA, H. M. G.; TAPPIN, M. R. R.; BEHRENS, M. D. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos**, v. 11, 2017. DOI: 10.5935/2446-4775.20170016.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero Maytenus Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. 1992. 253p. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia Vegetal) – UNICAMP, Campinas-SP.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442-51, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.036.

CHATTERJEE, A.; KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. A validated HPLC-PDA method for identification and quantification of two bioactive alkaloids, ephedrine and cryptolepine, in different *Sida* species. **Biomed. Chromatogr.**, v. 27, p. 1720-1725, 2013. DOI: 10.1002/bmc.2985.

CHENG, Y.; WU, C.; HO, C.; YEN, G. Catechin protects against ketoprofen-induced oxidative damage of the gastric mucosa by up-regulating Nrf2 in vitro and in vivo. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 475-483, 2013. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.01.010.

CHENG, S.; ZHANG, Z.; HU, C.; XING, N.; XIA, Y.; PANG, B. Pristimerin Suppressed Breast Cancer Progression via miR-542-5p/DUB3 Axis. **Onco Targets Ther.**, v. 13, p. 6651-6660, 2020. DOI: 10.2147/OTT.S257329.

CHERUIYOT, E. K.; MUMERA, L. M.; NG'ETICH, W. K.; HASSANALI, A.; WACHIRA, F.; WANYOKO, J. K. Shoot epicatechin and epigallocatechin contents respond to water stress in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, n. 5, p. 1219-1226, 2008. DOI: 10.1271/bbb.70698.

CHIMIN, A.; LIMA, E.; BELTRAME, F. L.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) comercializadas no estado do Paraná. **J. Pharm.**, v. 27, n. 4, p. 591-597, 2008.

CLIMATE-DATA.ORG - Clima: Santa Rita-PB. Disponível em: < <http://pt.climate-data.org/location/4451/> > Acesso em: 03 de janeiro de 2017.

CLIMATE-DATA.ORG - Clima: Boa Vista-PB. Disponível em: < <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/paraiba/boa-vista-3894/> > Acesso em: 11 de outubro de 2018.

COMPAORÉ, M.; MEDA, R. N.; BAKASSO, S.; VLASE, L.; KIENDREBEOGO, M. Antioxidative, anti-inflammatory potentials and phytochemical profile of *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. (Burseraceae) and *Loeseneriella africana* (Willd.) (Celastraceae) stem leaves extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 665-670, 2016. DOI: 10.1016/j.apjtb.2016.06.001.

CORDELLA, C. B. Y. PCA: The Basic Building Block of Chemometrics. In: KRULL, I. S. **Analytical Chemistry**, IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/51429.

CORREIA, L. P.; DE SANTANA, C. P.; DA SILVA, K. M. A.; RAMONS JUNIOR, F. J. L.; LIMA, R. S. C.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A. C. D.; MACEDO, R. O. Physical and chemical characteristics of *Maytenus rigida* in different particle sizes using SEM/EDS, TG/DTA and pyrolysis GC-MS. **J Therm Anal Calorim**, v. 131, p. 743-752, 2018. DOI: 10.1007/s10973-016-5999-0.

COSTA, N. C.; GOMES, L. M.; COSTA, T. M. F.; FIGUEIREDO, P. M. S.; SCHEIDT, G. N., Prospecção fitoquímica básica dos componentes fenólicos da casca do cajueiro. **Journal of basic and applied pharmaceutical sciences**, v. 36, 2015.

COSTA SILVA, T. D. ; JUSTINO, A. B. ; PRADO, D. G. ; KOCH, G. A. ; MARTINS, M. M. ; SANTOS, P. D. S. ; MORAIS, S. A. L. ; GOULART, L. R. ; CUNHA, L. C. S. ; SOUSA, R. M. F. ; ESPINDOLA, F. S. ; OLIVEIRA, A.

Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops and Products**, v. 140, a111641, 2019. DOI : 10.1016/j.indcrop.2019.111641.

CRISTIANS, S.; MATA, R.; BYE, R. Phenological and geographical influence in the concentration of selected bioactive 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Hintonia latiflora* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 308-313, 2014. DOI : 10.1016/j.jep.2013.12.054.

ĆUJIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIĆ, G.; IBRIĆ, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chem**, v. 194, p. 135-142, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.008.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998. DOI: 10.1351/pac199870040993.

DAO, H.; LAKHANI, P.; POLICE, A.; KALLAKUNTA, V.; AJJARAPU, S. S.; WU, K.; PONKSHE, P.; REPKA, M. A.; MURTHY, N. Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p. 60-78, 2018. DOI: 10.1208/s12249-017-0875-1.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Flavonóides e Triterpenos de *Stigmaphylloides paralias*. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 4-487, 2003. DOI: 10.1590/S0100-40422003000400007.

DE-LA-CRUZ CHACÓN, I.; RILEY-SALDAÑA, C.A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Secondary metabolites during early development in plants. **Phytochem Rev**, v. 12, p. 47-64, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9250-8.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V.; The use of experimental design in separation science. **Acta Chromatogr.**, v. 21, n. 2, p. 161-201. DOI: 10.1556/achrom.21.2009.2.1.

DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 3, p. 1425-1430, 2008. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.10.071.

DEL BUBBA, M.; CHECCHINI, L.; CHIUMINATTO, U.; DOUMETT, S.; FIBBI, D.; GIORDANI, E. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of *Fragaria vesca* L. berries and their comparative evaluation. **Journal of mass spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1207-20, 2012. DOI: 10.1002/jms.3030.

DEL VALLE, J. C.; BUIDE, M. L.; WHITTALL, J. B.; VALLADARES, F.; NARBONA, E. UV radiation increases phenolic compound protection but

decreases reproduction in *Silene littorea*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 6, e0231611, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0231611.

DEMARQUE, D. P.; CALLEJON, D. R.; OLIVEIRA, G. G.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; LOPES, N. P. The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 4, p. 425-432, 2018. DOI: 10.1016/j.bjfp.2018.03.011.

DENG, B.; LI, Y.; XU, D.; YE, Q.; LIU, G. Nitrogen availability alters flavonoid accumulation in *Cyclocarya paliurus* via the effects on the internal carbon/nitrogen balance. **Sci Rep**, v. 9, a2370, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-38837-8.

DE SOUZA, R.; SALDANHA-CORRÊA, F.; GALLEGOS, A. G.; NETO, A. Semi-quantitative determination of ash element content for freeze-dried, defatted, sulfated and pyrolysed biomass of *Scenedesmus sp.* **Biotechnology for biofuels**, v. 13, n. 63, p. 1-12, 2020. DOI: 10.1186/s13068-020-01699-8.

DE VIJLDER, T.; VALKENBORG, D.; LEMIÈRE, F.; ROMIJN, E. P.; LAUKENS, K.; CUYCKENS, F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. **Mass spectrometry reviews**, v. 37, n. 5, p. 607–629, 2018. DOI: 10.1002/mas.21551.

DEWICK, P. M., **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3^a ed, Wiley, 546p., 2009.

DIAS, K. S., MARQUES, M. S., MENEZES, I. A. C., SANTOS, T.C., SILVA, A. B. L., ESTEVAM, C. S., SANT'ANA, A. E. G., PIZZA, C., ANTONIOLLI, A. R., MARÇAL, R. M. Antinociceptive activity of *Maytenus rígida* stem bark. **Fitoterapia**, v.78, p.7-8, 2007. DOI: 10.1016/j.fitote.2007.02.017.

DÍAZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E.; TOLEDO-ARAYA, H. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 331-335, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.07.012.

DIN, A. U.; UDDIN, G.; HUSSAIN, N.; IQBAL, C. M. Ficusonic acid: a new cytotoxic triterpene isolated from *Maytenus royleanus* (Wall. ex M. A. Lawson) cufodontis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 663-668, 2013. DOI: 10.5935/0103-5053.20130084.

DJORDJEVIC, S. M. From Medicinal Plant Raw Material to Herbal Remedies. *In: Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature*, EL-SHEMY, H. A. (eds), IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/66618.

DONOVAN, J.L.; CRESPI, V.; OLIVEIRA, M.; COOPER K.A.; GIBSON, B.B.; WILLIAMSON, G. (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: Relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. **Free Radical Research.**, v. 40, p.1029-1034, 2006. DOI: 10.1080/10715760600868545.

DUARTE, M. C. **Constituíntes químicos de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek.** 2013. 144p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

DUARTE, M. C.; TAVARES, J. F.; MADEIRO, S. A.; COSTA, V. C. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; BRAZ FILHO, R.; SILVA, M. S. Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 10, p. 1697-1700, 2013. DOI:10.5935/0103-5053.20130205.

DUARTE, R. S. **Desenvolvimento e validação do método de quantificação de catequinas e caracterização de extratos de folhas de *Maytenus* ssp utilizando uhplc/ms.** 2019. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; BAJSA, J.; MEEPAGALA, K. M.; HUFBAUER, R. A.; BLAIR, A. C. The case against (-)-catechin involvement in allelopathy of *Centaurea stoebe* (spotted knapweed). **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 422–424, 2009. DOI:10.1007/s10886-008-9587-z.

DUMANČIĆ, S.; BLOCKEL, H. An expressive dissimilarity measure for relational clustering using neighbourhood trees. **Mach Learn**, v. 106, p. 1523–1545, 2017. DOI: 10.1007/s10994-017-5644-6.

EMA – European Medicines Agency. **Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products.** London, p. 1-3, 2010. Disponível em:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-stability-testing-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal-products_en.pdf

EMA – European Medicines Agency. **Guideline on bioanalytical method validation.** EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), July 21, 2011. Disponível em:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.

EMA – European Medicines Agency. **Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions;** London, p. 1-15, 2016. Disponível em:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf

ENGLE, S.; WHALEN, S.; JOSHI, A.; POLLARD, K. S. Unboxing cluster heatmaps. **BMC Bioinformatics**, v. 18, a63, 2017. DOI: 10.1186/s12859-016-1442-6.

EPSHTEIN, N. A. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control. **Pharm Chem J.**, v. 38. p. 212-227, 2004.

EPSHTEIN, N.A. System Suitability Requirements for Liquid Chromatography Methods: Controlled Parameters and their Recommended Values (Review). **Pharm Chem J.**, v. 54, p. 518–525, 2020. DOI: 10.1007/s11094-020-02231-w

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. Wiley: New Jersey, 2006.

ESTEVAM, C.S. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 192p. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL.

ESTELL, R. E.; FREDRICKSON, E. L.; JAMES, D. K. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 65, p. 108-114, 2016. DOI: 10.1016/j.bse.2016.02.019.

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, E. V. F.; ARAUJO NETO, V.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 299-303, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000200020.

EVANS, W. C., **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 14^a ed., WB Saunders Company: London, 1996.

FABRE, N. ; RUSTAN, I. ; DE HOFFMANN, E. ; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 12, n. 6, p. 707-715, 2001. DOI: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4.

FALKOWSKI, M. ; JAHN-OYAC, A. ; ODONNE, G. ; FLORA, C. ; ESTEVEZ, Y. ; TOURÉ, S. ; BOULOGNE, I. ; ROBINSON, J. ; BEREAU, D. ; PETIT, P. ; AZAM, D. ; COKE, M. ; ISSALY, J. ; GABORIT, P. ; STIEN, D. ; EPARVIER, V. ; DUSFOUE, I. ; HOUEL, E. Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 201, p. 1-12, 2020. DOI : 10.1016/j.actatropica.2019.105179.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, 2002. DOI: 10.1021/jf0201327.

FARIA, S. M. ; NOBREGA, H. N. ; FERREIRA, J. A. B. ; MARIN, V. A. Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 549-556, 2012.

FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 21, p. 6499–6517, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i21.6499.

FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry, analytical procedures and methods validation**. Rockville, 2000.

FDA - US Department of Health Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Guidance for Industry**; Rockville, p. 1-18, 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>

FDA - US Department of Health Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Botanical drug development guidance for industry**. Silver Spring, Maryland, 1-30, 2016.

FENG, W.; HAO, Z.; LI, M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. In: JUSTINO, G. C. (eds) **Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health**, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/67810.

FERRAZ, A. C.; MORAES, T. F. S.; NIZER, W. S. D. C.; SANTOS, M. D.; TOTOLA, A. H.; FERREIRA, J. M. S.; VIEIRA-FILHO, S. A.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; BRITO MAGALHÃES, C. L.; MAGALHÃES, J. C. Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral Res**, 168, p. 76-81, 2019. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.05.008.

FERREIRA, R. G.; TÁVORA, F. J. A.; HERNANDEZ, F. F. F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesq. agropec. bras.**, v. 36, n. 1, p. 79-88, 2001.

FERREIRA, F. L. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae)**. 2014. 143p. Dissertação. (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

FERREIRA, F. L.; RODRIGUES, V. G.; SILVA, F. C.; MATILDES, B. L. G.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, D. M.; FILHO, S. A. V. *Maytenus distichophylla* and *Salacia crassifolia*: source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 471-474, 2017. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.12.006.

FIGUEIREDO, P. T. R. **Isolamento, identificação e análise quimioinformática de triterpenos da espécie *Maytenus erythroxylon* Reissek**. 2019. 123p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá: obtenção de extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica.** 2009. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE.

FORIM, M. R.; PERLATTI, B.; COSTA, E. S.; MAGNANI, R. F.; SOUZA, G. D. Concerns and Considerations about the Quality Control of Natural Products Using Chromatographic Methods. **Current Chromatography**, v. 2, p. 20-31, 2015. DOI: 10.2174/2213240601666141113212732.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; DE FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochem Anal**, v. 29, n. 2, p. 196-204, 2018. DOI: 10.1002/pca.2734.

FREIRE, M. F. I. Metais pesados e plantas medicinais. **Revista Ciência Agronômica**, ano IV, n. 8, 2005.

FREIRE, M. O. **Estudo fitoquímico e psicofarmacológico das raízes de *Maytenus obtusifolia* Mart. (CELASTRACEAE).** 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of teaflavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p.116-134, 2006.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur Food Res Technol**, v. 211, p. 56–64, 2000. DOI: 10.1007/s002170050589.

GALAVERNA, R.S.; SAMPAIO, P.T.B.; BARATA, L.E.S.; EBERLIN, M.N.; FIDELIS, C.H.V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian *Aniba* species by mass spectrometry leaf fingerprinting. **Anal. Methods.**, v. 7, n. 5, p. 1984–1990, 2015.

GAN, K.; XU, L.; FENG, X.; ZHANG, Q.; WANG, F.; ZHANG, M.; TAN, W. Celastrol attenuates bone erosion in collagen-Induced arthritis mice and inhibits osteoclast differentiation and function in RANKL-induced RAW264.7. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 239-246, 2015. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.12.012.

GERSHENZON, J.; ENGELBERTH, J. E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. p. 369-400.

GHARIBI, S.; TABATABAEI, B. E. S.; SAEIDI, G.; TALEBI, M.; MATKOWSKI, A. The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech.f.

Phytochemistry, v. 162, p. 90-98, 2019. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.03.004.

GHOSH, A.; NASHAAT, M.; MILLER, J.; QUADER, S.; MARSTON, C. A comprehensive review of tools for exploratory analysis of tabular industrial datasets. **Visual Informatics**, v. 2, n. 4, p. 235-253, 2018. DOI: 10.1016/j.visinf.2018.12.004.

GINDRI, A. L.; LAPORTA, L. V.; SANTOS, M. R. Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 563-570. DOI: 10.1590/S1516-05722012000300020.

GLASSEY, J. Multivariate data analysis for advancing the interpretation of bioprocess measurement and monitoring data. In: MANDENIUS, C-F.; TITCHENER-HOOKER, N. J. (eds) **Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocesses**, v. 132. Berlin, Germany: Springer; 2013. p. 167-191.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P., Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, V. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L.; BAUERMEISTER, A.; SAKAMOTO, H. T.; GOUVEA, D. R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Spatial and Temporal Variations in Secondary Metabolites Content of the Brazilian Arnica Leaves (*Lychnophora ericoides* Mart., Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2382-2390, 2017. DOI: 10.21577/0103-5053.20170092.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. 2008. 86f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo – SP.

GOMES, A. F. ; ALMEIDA, M. P. ; LEITE, M. F. ; SCHWAIGER, S. ; STUPPNER, H. ; HALABALAKI, M. ; AMARAL, J. G. ; DAVID, J. M. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*, **Food Chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019. DOI : 10.1016/j.foodchem.2017.11.089.

GONZALEZ, A. G. ; FRAGA, B. M. ; GONZALEZ, P. ; MARTA, M. ; MONACHE, F. D. ; MARINI-BETTOLO, G. B. ; MELLO, J. F. ; GONÇALVES, O. A revised structure for the triterpene rigidanol, **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 470-471, 1982. DOI : 10.1016/S0031-9422(00)95296-8.

GONZÁLEZ, A. G. ; BAZZOCCHI, I. L. ; MOUJIR, L. ; JIMÉNEZ, I. A. Ethnobotanical uses of celastraceae. Bioactive metabolites. In : RAHMAN, A. (Ed) **Studies in Natural Products Chemistry**. v. 23, Elsevier, p. 649-738, 2000. DOI : 10.1016/S1572-5995(00)80140-4.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea*

bomplandii and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.

GONZÁLEZ ; A. G. ; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profile. **Trends Anal. Chem.**, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007. DOI : 10.1016/j.trac.2007.01.009.

GONZALEZ-VILLAGRA, J. ; RODRIGUES-SALVADOR, A. ; NUNES-NESI, A. ; COHEN, J. D. ; REYES-DIAZ, M. M. Age-related mechanism and its relationship with secondary metabolism and abscisic acid in *Aristotelia chilensis* plants subjected to drought stress. **Plant Physiol Biochem**, v. 124, p. 136-145, 2018. DOI : 10.1016/j.plaphy.2018.01.010.

GOUINGUENE, S. P. ; TURLINGS, T. C. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant physiology**, v. 129, n. 3, p. 1296–1307, 2002. DOI :10.1104/pp.001941.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; MELONI, F.; AMARAL, J. G. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus matogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012001100007.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 24, n. 13, p. 1851-68, 2010. DOI: 10.1002/rcm.4585.

GRISHKO, V. V. ; GALAIKO, N. V. Structural Diversity, Natural Sources and Pharmacological Potential of Naturally Occurring A-Seco-Triterpenoids. *In* : RAHMAN, A. **Studies in Natural Products Chemistry**. Vol 51. Elsevier, 2016. p. 51-149. DOI : 10.1016/B978-0-444-63932-5.00002-4.

GU, D.; YANG, Y.; ABDULLA, R.; AISA, H. A. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 26, p. 83-100, 2012. DOI: 10.1002/rcm.5289.

GU, H., WANG, Y., XIE, H.; QIU, C. ; ZHANG, S. ; XIAO, J. ; LI, H. ; CHEN, L. ; LI, X. ; DING, Z. Drought stress triggers proteomic changes involving lignin, flavonoids and fatty acids in tea plants. **Sci Rep**, v. 10, a15504, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-72596-1

GULL, A.; LONE, A. A.; WANI, N. U. I. Biotic and Abiotic Stresses in Plants. *In*: OLIVEIRA, A. B. **Abiotic and Biotic Stress in Plants**, IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.85832.

GUPTA, V. ; SHARMA, M., Phytochemical Analysis and Evaluation of Antioxidant Activities of Methanolic Extracts of *Maytenus emarginata*. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 16, n. 5, p. 257-262, 2012.

GUPTA, V.; JAIN, A. D. K.; GILL, N. S.; GUPTA, K. Development and validation of HPLC method – a review. **Int. Res J Pharm. App Sci.**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

GUPTA, M.; KAPOOR, B.; GUPTA, R.; SINGH, N. Plants and phytochemicals for treatment of peptic ulcer: An overview. **South African Journal of Botany**, v. 138, p. 105-114, 2021. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.11.030.

GUTIÉRREZ-NICOLÁS, F.; OBERTI, J. C.; RAVELO, A. G.; ESTEVEZ-BRAUN, A. β -Agarofurans and Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus spinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 8, p. 1853-1863, 2014. DOI: 10.1021/np500317t

HADJADJ, S.; ESNAULT, M. A.; BERARDOCCO, S.; GUYOT, S.; BOUCHEREAU, A.; GHOUINI, F.; LAMINI, R.; HADJ-KHELIL, A. O, E. Polyphenol composition and antioxidant activity of *Searsia tripartita* and *Limoniastrum guyonianum* growing in Southeastern Algeria. **Scientific African**, v. 10, 2020. DOI: 10.1016/j.sciaf.2020.e00585.

HAIDA, K. S.; HAAS, J.; LIMA, D. S.; HAIDA, K. Y.; SILVA, F. J.; LIMANA, S.; RODRIGUES, R. T. Atividade antioxidante e compostos fenólicos de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 2, p. 360-368, 2012.

HAIR, J. F. J.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman: Artmed, 688 p. 2009.

HAN, J.; YE, M.; QIAO, X.; XU, M.; WANG, B. R.; GUO, D. A. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 47, n. 3, p. 516-525, 2008. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.02.013.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. Londres: Chapman & Hall, 1994.

HINZ, D. C. Efficiency improvement for sulfated ash determination by usage of a microwave muffle furnace. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 43, p. 1881-1884, 2007. DOI : 10.1016/j.jpba.2007.01.005.

HONG, C. ; CHANG, C. ; ZHANG, H. ; JIN, Q. ; WU, G. ; WANG, X. Identification and characterization of polyphenols in different varieties of *Camellia oleifera* seed cakes by UPLC-QTOF-MS. **Food Res Int.**, v. 126, 108614, 2019. DOI : 10.1016/j.foodres.2019.108614.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?. **Phytochem Rev**, v. 16, p. 55–95, 2017. DOI: 10.1007/s11101-015-9448-7.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGRE-008. Rio de Janeiro, 2016.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, n. 39, 2019. DOI :10.1186/s40659-019-0246-3.

JAIN, P. Secondary metabolites for antiulcer activity. **Natural Product Research**, v. 30, n. 6, p. 640-656, 2016. DOI: 10.1080/14786419.2015.1036269.

KADIAN, N. ; RAJU, K. S. R.; RASHID, M. ; MALIK, M. Y. ; TANEJA, I. ; WAHAJUDDIN, M. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 126, p. 83–97, 2016.

KLEIN, L. ; SPRENGER, S. C. ; PEREZ, E. Controle de qualidade de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae (Espinheira-santa). In : **Anais da SIEPE – Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão**, Guarapuava-PR, 2009.

KOSALEC, I. ; CVEK, J. ; TOMIC, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arh Hig Rada Toksikol.**, v. 60, n. 4, p. 485-501, 2009. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-2005.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012. DOI: 10.5897/IJBC11.163

LANDIM, P. M. B. **Introdução à análise estatística de dados geológicos multivariados**. Depto Geografia Aplicada, UNESP/Rio Claro, Texto didático nº 15. 229 p. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/igce/aplicada/textodi.html>. Acesso em: 02 de maio de 2021.

LEE, J. ; KIM, L. ; SHIN, Y. ; LEE, J. ; LEE, J. ; KIM, E. ; MOON, J. K. ; KIM, J. H. Rapid and Simultaneous Analysis of 360 Pesticides in Brown Rice, Spinach, Orange, and Potato Using Microbore GC-MS/MS. **J Agric Food Chem.**, v. 65, n. 16, p. 3387-3395, 2017. DOI : 10.1021/acs.jafc.7b00576.

LEME, T. S. V ; PRANDO, T. B. L. ; GASPAROTTO, F. M. ; SOUZA, P. ; CRESTANI, S. ; SOUZA, L. M. ; CIPRIANI, T. R. ; LOURENÇO, E. L. B. ; JUNIOR, A. G. Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 154-161, 2013. DOI : 10.1016/j.jep.2013.08.032.

LI, B. ; FAN, R. ; SUN, G.; SUN, T. ; FAN, Y. ; BAI, S. ; GUO, S. ; HUANG, S. ; LIU, J. ; ZHANG, H. ; WANG, P. ; ZHU, X. ; SONG, C. Flavonoids improve drought tolerance of maize seedlings by regulating the homeostasis of reactive oxygen species. **Plant Soil**, 2021. DOI : 10.1007/s11104-020-04814-8.

LIN, L. Z.; SUN, J.; CHEN, P.; MONAGAS, M, J.; HARNLY, J. M. UHPLC-PDA-ESI/HRMSn Profiling Method To Identify and Quantify Oligomeric Proanthocyanidins in Plant Products. **J. Agric. Food Chem.** v. 62, p. 9387–9400, 2014. DOI: 10.1021/jf501011y.

LIU, W. ; YIN, D. ; LI, N. ; HOU, X. ; WANG, D. ; LI, D. ; LIU, J. Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment. **Sci Rep**, v. 6, a28591, 2016. DOI : 10.1038/srep28591.

LU, L. ; LU, X. ; GUO, Y. ; MEI, S. ; LI, X. Dihydroagarofuran sesquiterpene derivatives from the stems of *Tripterygium hypoglauicum* and activity evaluation, **Tetrahedron Letters**, v. 61, n. 25, 2020. DOI : 10.1016/j.tetlet.2020.151992.

LUCA, C.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. Triterpenoid quinones of *Maytenus obtusifolia* and *Maytenus boaria*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 9, p. 208-209, 1978.

HENRIQUE, J. R. ; VENDRAMINI, E. A. ; REIS, R. D. ; MARQUES, L. C. ; MARCUCCI, M. C. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. **Rev. Fitoter**, v. 14, n. 2, p. 129-136, 2014.

HICHRI, I. ; BARRIEU, F. ; BOGS, J. ; KAPPEL, C. ; DELROT, S. ; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2465–2483, 2011. DOI :10.1093/jxb/erq442.

HIEN, H. M.; HENG, P. W. S.; THI, N. V.; CU, N. K. Q.; HUE, V. T. B. Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of calophyllolide in *Calophyllum inophyllum* L.: a quality control approach. **Chinese J. Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 429-434, 2011.

HONG, G.; WANG, J.; ZHANG, Y.; HOCHSTETTER, D.; ZHANG, S.; PAN, Y.; SHI, Y.; XU, P.; WANG, Y. Biosynthesis of catechin components is differentially regulated in dark-treated tea (*Camellia sinensis* L.). **Plant Physiol Biochem**, v. 78, p. 49-52, 2014. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.02.017.

HOWARTH, R. E., Antiquity factors and non-nutritive chemical components. In: HANSON, A. A., BARNES, D. K., HILL JR., R. R. (Eds.), **Alfalfa and Alfalfa Improvement**. ASA Inc., CSSA Inc., SSSA Inc. Publishers, Madison, USA, p. 493–514, 1998.

HUANG, Y.; SHI, R.; GEE, W.; BONDERUD, R. Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 3, p. 271-279, 2012. DOI: 10.4155/bio.11.315.

IANNUZZI, L.; MAIA, A. C. D.; NOBRE, C. E. B.; SUZUKI, D. K.; MUNIZ, F. J. A. Padrões locais de diversidade de Coleoptera (Insecta) em vegetação de Caatinga. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (orgs). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE, p. 367-389, 2003.

IBRAHIM, M. H.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A.; RAHMAN, Z. A. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Blume). **Int J Mol Sci.**, v. 12, n. 8, p. 5238-54, 2011. DOI: 10.3390/ijms12085238.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Q1AR2 - Stability Testing of New Drugs Substances and Products**. Food and Drug Administration, USA, 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Food and Drug Administration, USA, 2005.

ILIEVA, A., Changes in saponin content of lucerne for forage. In: **Management and Breeding of Perennial Lucerne for Diversified Purposes**, REUR Technical Series, v. 36. FAO, Rome, Italy, p. 125–127, 1994.

INDERJIT, P. J. L.; CALLAWAY, R. M.; HOLBEN, W. Phytotoxic Effects of (\pm)-Catechin In vitro, in Soil, and in the Field. **PLOS ONE**, v. 3, n. 7, e2536, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0002536.

INDRAYANTO, G. Validation method of analysis. In: BRITTAIN, H. G. (Ed.), **Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology**, vol. 37, Elsevier Academic Press, New York, p. 439–465, 2012.

INDRAYANTO, G. Recent Development of Quality Control Methods for Herbal Derived Drug Preparations. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 12, p. 1599-1606, 2018. DOI: 10.1177/1934578X1801301208.

JAHONGIR, H.; MIANSONG, Z.; AMANKELDI, I.; YU, Z.; CHANGHENG, L. The influence of particle size on supercritical extraction of dog rose (*Rosa canina*) seed oil. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 31, n. 2, p. 140-143, 2019. DOI: 10.1016/j.jksues.2018.04.004.

JAYASINGHE, S. L.; KUMAR, L. Potential impact of the current and future climate on the yield, quality, and climate suitability for tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]: a systematic review. **Agronomy**, v. 11, n. 4, a.619, 2021. DOI: 10.3390/agronomy11040619.

JING, J.; REN, W. C.; CHEN, S. B.; WEI, M.; PAREKH, H. S. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines.

Trend in Analytical Chemistry, v. 44, p. 39-45, 2013. DOI: 10.1016/j.trac.2012.11.006.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 374, n. 2065, a20150202, 2016. DOI: 10.1098/rsta.2015.0202.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93–100, 2004.

JURGONSKI, A. ; BILLING-MARCZAK, K. ; JUSKIEWICZ, J. ; KROTKIEWSKI, M. Formulation of a Mixture of Plant Extracts for Attenuating Postprandial Glycemia and Diet-Induced Disorders in Rats. **Molecules**, v. 24, n. 20, 3669, 2019. DOI : 10.3390/molecules24203669.

JURIC, S. ; SOPKO STRACENSKI, K. ; KROL-KILINSKA, Ž.; ŽUTIC, I. ; UHER, S. F. ; DERMIC, E. ; TOPOLOVEC-PINTARIC, S. ; VINCEKOVIC, M. The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents. **Sci Rep**, v. 10, a3737, 2020. DOI : 10.1038/s41598-020-60690-3.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **J Mass Spectrom.**, v. 36, n. 2, p. 169-178, 2001. DOI: 10.1002/jms.118.

KAMACHI, H.; KOMORI, I.; TAMURA, H.; SAWA, Y.; KARAHARA, I.; HONMA, Y.; WADA, N.; KAWABATA, T.; MATSUDA, K.; IKENO, S.; NOGUCHI, M.; INOUE, H. Lead tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*. **J Plant Res.**, v. 118, n. 2, p. 137-145, 2005. DOI: 10.1007/s10265-005-0202-x.

KANG, J.; PRICE, W. E.; ASHTON, J.; TAPSELL, L. C.; JOHNSON, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MS(n). **Food Chemistry**, v. 211, p. 215-226, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.052.

KARAGEORGOU, E. ; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **J Chromatogr A.**, v. 1353, p. 131-139, 2014. DOI :10.1016/j.chroma.2014.01.050.

KATEROVA, Z. ; TODOROVA, D. ; TASHEVA, K. ; SERGIEV, I. Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. **Genetics and Plant Physiology**, v. 2, p. 113-144, 2012.

KAUSHIK, S.; BAIS, H. P.; BIEDRZYCKI, M. L.; VENKATACHALAM, L. Catechin is a phytotoxin and a pro-oxidant secreted from the roots of *Centaurea stoebe*. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 9, p. 1088–1098, 2010. DOI: 10.4161/psb.5.9.11823.

KELLOGG, J.J. ; PAYNE, M. F. ; MCCUNE, J. S. ; OBERLIES, N. H. ; CECH, N. B. Selection and characterization of botanical natural products for research studies: a NaPDI center recommended approach. **Nat. Prod. Rep.**, Advance Article, v. 36, n. 8, p. 1196-1221, 2019. DOI : 10.1039/c8np00065d.

KERMEZ, Z.; CHETRIT, D.; SHOSEYOV, O.; REGEV-SHOSANI, G. Protection of lipids from oxidation by epicatechin, trans-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 10288-10293, 2006.

KHAZIR, J.; RILEY, D. L.; PILCHER, L. A.; DE-MAAYER, P., MIR, B. A., Anticancer agents from diverse natural sources. **Natural product communications**, v. 9, n. 11, p. 1655-1669, 2014.

KIM, H.K.; VERPOOTE, R., Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 4-13, 2009.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical reviews**, v. 2, n. 1-4, p. 23–60, 2010. DOI: 10.1007/s12566-010-0015-9.

KPOYIZOUN, P. K.; METOWOGO, K.; KANTATI, Y. T.; MISSEBUKPO, A.; DARE, T.; LAWSON-EVI, P.; EKLU-GADEGBEKU, K.; AKLIKOKOU, K. A. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of *Maytenus senegalensis* hydroalcoholic roots extract fractions in allergic asthma. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 252-257, 2020. DOI: 10.31254/phyto.2020.9407.

KOFINK, M; PAPAGIANNOPoulos, M.; GALENSA, R., (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1274-1288, 2007.

KÖHLER, N; WRAY, V.; WINTERHALTER, P., New Approach for the Synthesis and Isolation of Dimeric Procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5374–5385, 2008.

KOPARDE, A. A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural Products in Drug Discovery. In: PERVEEN, S.; AL-TAWEEL, A. (eds) **Pharmacognosy - Medicinal Plants**, IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.82860.

KOVACEVIC, V.; SIMPSON, M.J. Fundamentals of environmental metabolomics. In: MUÑOZ, D. A.; FARRÉ, M. (eds) **Environmental Metabolomics**, Elsevier, p. 1-33, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-818196-6.00001-7.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. **Anal Chim Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.017.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, Article ID 162750, p. 1-16, 2013. DOI:10.1155/2013/162750.

KUMAR, V.; CHHABRA, J. K.; KUMAR, D. Performance Evaluation of Distance Metrics in the Clustering Algorithms. **INFOCOMP**, v. 13, n. 1, p. 38-51, 2014.

KUMAR, S.; ABEDIN, M. M.; SINGH, A. K.; DAS, S. Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In: LONE, R.; SHUAB, R.; KAMILI, A. (eds) **Plant Phenolics in Sustainable Agriculture**. Springer, Singapore, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-4890-1_22

LEE, K. M.; JEON, J. Y.; LEE, B. J.; LEE, H.; CHOI, H. K. Application of Metabolomics to Quality Control of Natural Product Derived Medicines. **Biomolecules & therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 559–568, 2017. DOI:10.4062/biomolther.2016.249.

LEISSO, R.; DAVE, R.; MARK, M. Targeted Metabolic Profiling Indicates Apple Rootstock Genotype-Specific Differences in Primary and Secondary Metabolite Production and Validate Quantitative Contribution From Vegetative Growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, a1336, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01336.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 7, 2008. DOI:10.1186/1749-8546-3-7.

LI, X.; CHEN, H.; JIA, W.; XIE, G. A Metabolomics-Based Strategy for the Quality Control of Traditional Chinese Medicine: Shengmai Injection as a Case Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 836179, 2013. DOI:10.1155/2013/836179.

LI, J.; WANG, X.; LUO, J.; KONG, L. Seasonal Variation of Alkaloid Contents and Anti-Inflammatory Activity of *Rhizoma coptidis* Based on Fingerprints Combined with Chemometrics Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 7, p. 1131–1139, 2015. DOI: 10.1093/chromsci/bmu175.

LI, J. J.; YAN, Y. Y.; SUN, H. M.; LIU, Y.; SU, C. Y.; CHEN, H. B.; ZHANG, J. Y. Anti-Cancer Effects of Pristimerin and the Mechanisms: A Critical Review. **Front Pharmacol.**, v. 10, p. 1-10, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00746.

LI, S.; LIN, Z.; JIANG, H.; TONG, L.; WANG, H.; CHEN, S. Rapid Identification and Assignment of the Active Ingredients in Fufang Banbianlian Injection Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. **J Chromatogr Sci.**, v. 54, n. 7, p. 1225-1237, 2016. DOI: 10.1093/chromsci/bmw055.

LILAND, K. H. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimentions reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 827-841, 2011. DOI: 10.1016/j.trac.2011.02.007.

LIMA, E. S.; VARGAS, F. S.; POHLIT, A. M. Antioxidant, Antiinflammatory and Antiplatelet Aggregating Activities of *Maytenus guyanensis* Bark Extract. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 7, p. 1107-1112, 2010.

LIMA, A. P.; LEITE, N. S.; CAMARGO, E. A.; ESTEVAM, C. S.; PANTALEÃO, S. M.; FERNANDES, R. P. M.; COSTAS, S. K. P.; MUSCARÁS, M. N.; THOMAZZI, S. M. Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico da casca da *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Scientia plena**, v. 6, n. 3, p. 1-7, 2010.

LIU, C.; CHENG, Y.; GUO, D.; ZHANG, T.; LI, Y.; HOU, W.; HUANG, L.; XU, H. A New Concept on Quality Marker for Quality Assessment and Process Control of Chinese Medicines. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 1, p. 3-13, 2017. DOI: 10.1016/S1674-6384(17)60070-4.

LIU, G. F.; HAN, Z. X.; FENG, L.; GAO, L. P.; GAO, M. J.; GRUBER, M. Y.; ZHANG, Z. L.; XIA, T.; WAN, X. C.; WEI, S. Metabolic Flux Redirection and Transcriptomic Reprogramming in the Albino Tea Cultivar 'Yu-Jin-Xiang' with an Emphasis on Catechin Production. **Sci Rep**, v. 7, a.45062, 2017. DOI: 10.1038/srep45062.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; ZENGIN, G.; UYSAL, S.; CEYLAN, R.; GULER, G. O.; MOCAN, A.; AKTUMSEK, A. *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities. **RSC Advances**, v. 6, n. 92, p. 88996-9006, 2016. DOI: 10.1039/C6RA17170B.

LLUSIA, J.; PEÑUELAS, J.; SECO, R.; FILELLA, I. Seasonal changes in the daily emission rates of terpenes by *Quercus ilex* and the atmospheric concentrations of terpenes in the natural park of Montseny, NE Spain. **J Atmos Chem**, v. 69, p. 215–230, 2012. DOI: 10.1007/s10874-012-9238-1.

LOESENER, T. Celastraceae. In: **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, v. 20b, ENGLER, A.; HARMS, H.; MATTFELD, J. Berlin: Duncker and Humblot, p. 87-197, 1942.

LOPES, G. C.; BLAINSKI, A.; SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; MELLO, J. C. P. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 781-788, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010005000024

LUCA, C.; LUCA, A.; CHIARA, M.; ROSSANA, C.; ROBERTA, A. Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of Synthetic and Natural Cannabinoids (New Psychoactive Substances) in Oral Fluid Samples by Means of HPLC-MS/MS. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, a439, p. 1-11, 2020. DOI: 10.3389/fchem.2020.00439.

LYDON, J.; CASALE, J. F.; KONG, H.; SULLIVAN, J. H.; DAUGHTRY, C. S. T.; BAILEY, B. The Effects of Ambient Solar UV Radiation on Alkaloid Production by *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1156-1161, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00562.x.

LYRA, W. S.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D.; VERAS, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594-1597. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700030.

MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. *In vitro and in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1788-1791, 1999. DOI:10.1128/AAC.43.7.1788

MACEDO, J. M.; SOUZA, L. G. P.; VALENZUELA, V. C. T.; OLIVEIRA, A. B.; CASTILHO, R. O.; JÁCOME, R. L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 585-590, 2013.

MAGALHÃES, C. G. **Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol**. 2012. 210p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

MAGALHÃES, C. G.; FÁTIMA-SILVA, G. D.; DUARTE, L. P.; TAKAHASHI, J. A.; SANTOS, V. R.; FIGUEIREDO, R. C.; VIEIRA FILHO, S. A., *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae): Avaliação da Atividade de Extratos e Constituintes contra *Helicobacter pylori* e Micro-organismos Patogênicos da Cavidade Oral. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2016.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. **Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics**. Eurachem, Dublin, 1-59, 2014. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf

MAIA, A. C. D.; IANNUZZI, L.; NOBRE, C. E. B.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Padrões locais de diversidade de Cerambycidae (Insecta, Coleoptera) em vegetação de Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (orgs). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.391-433, 2003.

MAIN, M. B.; MAIN, G. S.; MURIITHI, N. J.; KIAMBI, M. J.; UMAR, A.; JOHN, M. K.; MUTERO, N. G.; KELVIN, J. K.; ANN, N. W.; DAVID, M. N.; PIERO, N. M., Antinociceptive Properties of Dichloromethane: Methanolic Leaf Extracts of *Caesalpinia volkensii* and *Maytenus obscura* in Animal Models. **Journal of Pain & Relief**, v. 4, n. 2, p. 191, 2015.

MAKANJUOLA, S. A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. **Food science & nutrition**, v. 5, n. 6, p. 1179–1185, 2017. DOI: 10.1002/fsn3.509.

MANIKANDASELVI, S.; VADIVEL, V.; BRINDHA, P. Studies on physicochemical and nutritional properties of aerial parts of *Cassia occidentalis* L., **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 508-515, 2016. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.02.003.

MARCHIORO, C. A.; FOERSTER, L. A. Biotic factors are more important than abiotic factors in regulating the abundance of *Plutella xylostella* L., in Southern Brazil. **Rev. Bras. entomol.**, v. 60, n. 4, p. 328-333, 2016. DOI: 10.1016/j.rbe.2016.06.004.

MARIÑO, P. A.; MALDANER, G.; MENEZES, A. P. S.; REIS, R. O.; ASTA, A. P. D.; VARGAS, J. O.; ALVES, V. H.; TRINDADE, G. O. Phytochemical screening and assay of total polyphenols and flavonoids in different samples of holy thorn (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Braz. J. Hea. Rev.**, v. 2, n. 2, p. 1049-1062, 2019.

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

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L., Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARSON, B. M.; CONCENTINO, V.; JUNKERT, A. M.; FACHI, M. M.; VILHENA, R. O.; PONTAROLO, R. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. **Química Nova**, v.43, n. 8, p. 1190-1203, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170589.

MARTA, M.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MELLO, J. F.; LIMA, O. G. Rigidenol, a new triterpene with a lupane skeleton from *Maytenus rigida*. **ChemInform**, v. 10, n. 39, 1979. DOI:10.1002/chin.197939281.

MARTIN, J.; ADANA, D. D. R.; ASUERO, A. G. Fitting Models to Data: Residual Analysis, a Primer. In: HESSLING, J. P. (ed) **Uncertainty Quantification and Model Calibration**, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/68049.

MARTINS, M.V., ESTEVAM, C.S., SANTOS, A.L.L.M., DIAS, A.S., CUPERTINO-DA-SILVA, Y.K., ARAÚJO-JÚNIOR, J.X., MIRANDA, A.L.P., BARREIRO, E.J., PIZZA, C., PIACENTE, S., MONTORO, P., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., ARAUJO, B.S., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., SANT'ANA, A.E.G. Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound

of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, p. 598-603, 2012. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000007.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M. L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chem Biol Interact.**, v. 183, n. 3, p. 450-454, 2010. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.12.012.

MCKENNA, M. J.; SIMMONS, M. P.; BACON, C. D.; LOMBARDI, J. A. Delimitation of the segregation genera of *Maytenus*. **Systematic Botany**, v. 36, n. 4, p. 922-933, 2011. DOI: 10.1600/036364411X604930.

McMILLAN, J. Principles of Analytical Validation. In: CIBOROWSKI, P; SILBERRING, J. **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**, 2 ed, Elsevier, p. 239-251, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-444-63688-1.00013-6.

MEDEIROS, V. M. **Isolamento e Caracterização Estrutural dos Constituintes Químicos de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae)**. 2007. 190p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

MEDEIROS, V. M.; FILHO, J. G. S.; LUCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F.; MAIA, G. L. A.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 466-469, 2010.

MEDEIROS, D. B. ; SILVA, E. C. ; SANTOS, H. R. B. ; PACHECO, C. M. ; MUSSER, R. S. ; NOGUEIRA, R. J. M. C. Physiological and biochemical responses to drought stress in Barbados cherry. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 3, p. 181-192, 2012. DOI : 10.1590/S1677-04202012000300005.

MEES, M.; MEURER, M. C.; MARIANO, L. N. B.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; MARIOTT, M.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S. F.; DUARTE, L. P.; SOUSA, G. F.; SOUZA, P.; SILVA, L. M. *Maytenus robusta* Reissek, a medicinal plant popularly used to treat digestive diseases, promotes ameliorative effects in colon and liver of mice exposed to dextran sulfate sodium, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, 2020. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113180.

MELO, M. M. R.; ŞEN, A.; SILVESTRE, A. J. D.; PEREIRA, H.; SILVA, C. M. Experimental and modeling study of supercritical CO₂ extraction of *Quercus cerris* cork: Influence of ethanol and particle size on extraction kinetics and selectivity to friedelin. **Separation and Purification Technology**, v. 187, p. 34-45, 2017. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.06.011.

MELRO, J. C. L.; FONSECA, S. A.; SILVA-JUNIOR, J. M.; FRANCO, S. P. B.; SOUZA, M. A.; PIMENTEL, Y. F. C.; BOMFIM, M. R. P.; ALMEIDA, E. M.;

COSTA, J. G.; MATOS-ROCHA, T. J.; SANTOS, A. F. Ethnodirigid study of Medicinal plants used by the population assisted by the “Programa de Saúde da Família” (Family Health Program) in Marechal Deodoro - AL, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 410-423, 2020. DOI: 10.1590/1519-6984.214039.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, v. 12, p. 14821-14840, 2012. DOI: 10.3390/molecules171214821.

MENDOZA, D.; ARIAS, J. P.; CUASPUD, O.; ARIAS, M. Phytochemical Screening of Callus and Cell Suspensions Cultures of *Thevetia peruviana*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, e20180735, 2020. DOI: 10.1590/1678-4324-2020180735.

MIAO, W.; LUO, J.; LIU, J.; HOWELL, K.; ZHANG, P. The Influence of UV on the Production of Free Terpenes in *Vitis vinifera* cv. Shiraz. **Agronomy**, v. 10, n. 9, a1431, p. 1-13, 2020. DOI: 10.3390/agronomy10091431.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014. DOI: 10.3390/molecules191016240.

MILLER, J. N. Basic statistical methods for Analytical Chemistry: Part 2. Calibration and regression methods. **Analyst**, v. 116, p.3-14, 1991.

MOHAMAD, T. A. S. T.; NAZ, H.; JALAL, R. S.; HUSSIN, K.; RAHMAN, M. R. A.; ADAM, A.; WEBER, J. F. Chemical and pharmacognostical characterization of two Malaysian plants both known as Ajisamat. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 724-730, 2013. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500002.

MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B.; LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; COELHO, J. S. B. The structure of tingenone, a quinonoid triterpene related to pristimerin. **J. Chem. Soc.**, p. 2725-2728, 1973. DOI: 10.1039/P19730002725.

MONACHE, F. D.; POMPONI, M.; MARINI-BETTOLO, G. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, O. G. A methylated catechin and proanthocyanidins from the celastraceae. **Phytochemistry**, v. 15, p. 573-574, 1976. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88986-4.

MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B.; BERNAYS, E. A. Isolation of insect antifeedant alkaloids from *Maytenus rigida* (Celastraceae). **Zeitschrift Für Angewandte Entomologie**, v. 97, n. 1-5, p. 406–414, 1984. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1984.tb03768.x.

MOMTAZ, S.; HUSSEIN, A. A.; OSTAD, S. N.; ABDOLLAHI, M.; LALL, N. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 38-45, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2012.09.005.

MOORE, B. D.; ANDREW, R. L.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytol**, v. 201, p. 733-750, 2014. DOI:10.1111/nph.12526

MORY, B. Celastraceae. In : GREUTER, W. ; RODRIGUEZ, R. R. (Eds) **Flora de la República de Cuba, Série A, Plantas Vasculares**. Fascículo 16, Ruggell: Editorial Gantner, p. 3-80, 2010.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M.; PAROUL, N.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V., Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; DALLAGO, R.; LEONTIEV-ORLOV, O.; TREICHEL, H., Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1067-1070, 2010.

MOTA, K. S. L. **Atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart (Celastraceae) em modelos animais**. 2009. 149p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

MOTA, K. S.; DIAS, G. E.; PINTO, M. E.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979–1012, 2009. DOI: 10.3390/molecules14030979.

MOTERIYA, P.; PADALIA, H.; RATHOD, T.; MENPARAAND, D.; CHANDA, S. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Maytenus emarginata* leaf and stem. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 4, p. 202-220, 2014.

MOURA, F. B. R. **Efeito do uso tópico do extrato etanólico de folhas de *Maytenus ilicifoliana* reparo de feridas cutâneas**. 2017. 80p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

MÜLLNER, D. **Modern hierarchical, agglomerative clustering algorithms**. 2011. Disponível em: <https://arxiv.org/pdf/1109.2378.pdf>. Acesso em: 11/05/2021.

MUTUKU, A.; WANYOKO, J.; WACHIRA, F.; KAMUNYA, S.; CHALO, R.; KIMUTAI, S.; MOSETI, K.; KARORI, S. Influence of Geographical Regions on Catechin and Caffeine Levels in Tea (*Camellia sinensis*). **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 562-571, 2016. DOI: 10.4236/ajps.2016.73049.

NABAVI, S. M.; ŠAMEC, D.; TOMCZYK, M.; MILELLA, L.; RUSSO, D.; HABTEMARIAM, S.; SUNTAR, I.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; XIAO, J.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; YOUSEFI, B.; JEANDET, P.; XU, S.; SHIROOIE, S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, 2020. DOI:10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.

NAKABAYASHI, R.; MORI, T.; SAITO, K. Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, e29518, 2014. DOI: 10.4161/psb.29518.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 553-556, 2009. DOI:10.1590/S0102-695X2009000400007.

NEGRI, G.; BARRETO, L. M. R. C.; SPER, F. L.; CARVALHO, C.; CAMPOS, M. G. R. Phytochemical analysis and botanical origin of *Apis mellifera* bee pollen from the municipality of Canavieiras, Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2016176, 2018. DOI: 10.1590/1981-6723.17616.

NERI, P. M. S. **Extração de compostos fenólicos de *Maytenus rigida* Mart. (bom-nome): planejamento fatorial e atividade antimicrobiana**. 2016. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNO, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000600042.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.

NIZER, W. S. C.; FERRAZ, A. C.; MORAES, T. F. S.; LIMA, W. G.; SANTOS, J. P.; DUARTE, L. P.; FERREIRA, J. M. S.; MAGALHÃES, C. L. B.; VIEIRA-FILHO, S. A.; ANDRADE, A. C. S. P.; RODRIGUES, R. A. L.; ABRAHÃO, J. S.; MAGALHÃES, J. C. Pristimerin isolated from *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. (Celastraceae) roots as a potential antibacterial agent against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113423.

NORDEEN, S. K.; BONA, B. J.; JONES, D. N.; LAMBERT, J. R.; JACKSON, T. A. Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. **Horm Cancer.**, v. 4, n. 5, p. 293-300, 2013. DOI: 10.1007/s12672-013-0150-1.

NÚÑEZ, M. J.; ARDILES, A. E.; MARTINEZ, M. L.; TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. Unusual D:B-friedobaccharane and oxygenated friedelane-type triterpenoids from Salvadorean Celastraceae species. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 244-248, 2012. DOI: 10.1016/j.phytol.2012.01.004.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 169p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998

OLIVEIRA, D. R.; COSTA, A. L. M. A.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; SANTOS, J. P.; LEITÃO, S. G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

OLIVEIRA, D. P. **Caracterização química e avaliação biológica dos extratos hidroetanólicos de caule, folhas, glomérulos e raízes de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br (Lamiaceae)**. 2013. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

OLIVEIRA, F. G. S. **Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal**. 2015. 208p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE.

OLIVEIRA, R. M. **Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Maytenus ilicifolia* (Mart.ex Reissek)**. 2016. 57p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

OLIVEIRA, A. S. C. **Qualidade de espinheira-santa comercializada no mercado formal na cidade de Pelotas-RS**. 2016. 104p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

OLIVEIRA, J. F. S.; BASTOS, M. L. A.; VERÍSSIMO, R. C. S. S.; ARAUJO, M. G. S.; SILVA, A. L. L.; SILVA JUNIOR, E. F.; SANTOS JUNIOR, P. F. S.; ARAUJO, M. V.; MOREIRA, M. S. A.; ARAUJO JUNIOR, J. X.; BERNARDO, T. H. L. Phytochemical profile and evaluation of antibacterial and cytotoxic activity of *Maytenus rigida* (Mart.) extracts and fractions. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 8, n. 7, p. 746-751, 2016.

ONJIA, A. **Chemometric Approach to the Experiment Optimization and Data Evaluation in Analytical Chemistry**. Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade Publication, Serbia, p. 143, 2016.

OPPONG-DANQUAH, E.; PARROT, D.; BLÜMEL, M.; LABES, A.; TASDEMIR, D. Molecular Networking-Based Metabolome and Bioactivity Analyses of Marine-Adapted Fungi Co-cultivated With Phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. DOI:10.3389/fmicb.2018.02072.

OSORIO, A. A.; MUÑOZ, A.; TORRES-ROMERO, D.; BEDOYA, L. M.; PERESTELO, N. R.; JIMENEZ, I. A.; ALCAMI, J.; BAZZOCCHI, I. L. Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependent transcription. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 295-303, 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.03.035.

OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J.; EIFFERTH, T.; QU, F.; ZHOU, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P., Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 492-512, 2012.

PAITHANKAR, H. HPLC method validation for pharmaceuticals: a review. **Int J Univers Pharm Bio Sci.**, v. 2, n. 4, p. 229-240, 2013.

PAIVA, J. R., SOUZA, A. S. Q. ; PEREIRA, R. C. A. ; RIBEIRO, P. R. V. ; ZOCOLO, G. J. ; BRITO, E. S. ; PESSOA, O. D. L. ; CANUTO, K. M. Development and Validation of a UPLC-ESI-MS Method for Quantitation of the Anti-Alzheimer Drug Galantamine and other Amaryllidaceae Alkaloids in Plants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 265-272, 2020. DOI :10.21577/0103-5053.20190162

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, e47, 2016. DOI: 10.1017/jns.2016.41.

PÁLENÍKOVÁ, A.; HROUZKOVÁ, S.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO-FRENICH, A. **Determination of pesticide residues in selected nutraceutical products**. 1st International Symposium on Recent Developments in Pesticide Analysis. April 27-28, Prague, Czech Republic, 2015. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/18-Agnesa-Prezentation-Palenikova.pdf>.

PASCALE, R.; ACQUAVIA, M. A.; CATALDI, T. R. I.; ONZO, A.; COVIELLO, D.; BUFO, S. A.; SCRANO, L.; CIRIELLO, R.; GUERRIERI, A.; BIANCO, G. Profiling of quercetin glycosides and acyl glycosides in sun-dried peperoni di Senise peppers (*Capsicum annuum* L.) by a combination of LC-ESI(-)-MS/MS and polarity prediction in reversed-phase separations. **Anal Bioanal Chem.**, v. 412, n. 12, p. 3005-3015, 2020. DOI: 10.1007/s00216-020-02547-2.

PASTENE, E.; PARADA, V; AVELLO, M.; RUIZ, A.; GARCÍA, A. Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit *Helicobacter pylori* Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric Cells. **Phytother. Res.**, v. 28, p. 1637– 1645, 2014. DOI: 10.1002/ptr.5176

PAZ, T.A.; DOS SANTOS, V. A.; INÁCIO, M. C.; PINA, E. S.; PEREIRA, A. M.; FURLAN, M. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by in vitro adventitious roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 1-7, 2013. DOI: 10.1155/2013/485837.

PECETTI, L. ; TAVA, A. ; ROMANI, M. ; DE BENEDETTO, M. G. ; CORSI, P., Variety and environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (*Medicago sativa* L.). **European Journal of Agronomy**, v. 25, p. 187–192, 2006.

PECETTI, L.; BIAZZI, E.; TAVA, A. Variation in saponin content during the growing season of spotted medic *Medicago arabica* L Huds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 14, p. 2405-2410, 2010. PEREIRA, C.; BARROS, L.; JOSÉ ALVES, M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. Artichoke and milk thistle pills and syrups as sources of phenolic compounds with antimicrobial activity. **Food Funct.**, v. 7, n. 7, p. 3083-90, 2016. DOI: 10.1039/c6fo00512h.

PEREIRA, R. S.; AGUIAR, R. M.; LEMOS, G. S.; VIEIRA FILHO, S. A.; OLIVEIRA, D. M. Photoprotective property and cytotoxicity of polar extracts of three species of *Maytenus* native to the Southwest of Bahia. **Scientia plena**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2020. DOI: 10.14808/sci.plena.2020.027202.

PÉREZ, M.; SÁNCHEZ, M.; STUPAK, M.; GARCÍA, M.; ROJO, M. T.; OBERTI, J. C.; PALERMO, J. A.; BLUSTEIN, G. Antifouling Activity of Celastroids Isolated from *Maytenus* Species, Natural and Sustainable Alternatives for Marine Coatings. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 18, p. 7655-7659, 2014. DOI: 10.1021/ie4033507.

PETROPOULOS, S. ; FERNANDES, A. ; BARROS, L. ; CIRIC, A. ; SOKOVIC, M. ; FERREIRA, I. C. F. R. Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. **Food Chemistry**, v. 245, p. 7-12, 2018. DOI : 10.1016/j.foodchem.2017.10.078.

PIANOSKI, K. E.; TURCO, J. F.; SOARES, K. C. N.; MOKOCHINSKI, J. B.; CAETANO, I. K.; DA SILVA, F. R.; TORRES, Y. R. Identification and Characterization of *Bauhinia* Species by Spectroscopic and Spectrometric Fingerprints. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 5, p. 1222-1235, 2020. DOI : 10.21577/1984-6835.20200093.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B.: Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu; 2010.

PIRASTEH-ANOSHEH, H.; SAED-MOUCHESHI, A.; PAKNIYAT, H.; PESSARAKLI, M. Stomatal responses to drought stress. In: AHMAD, P. (Ed.) **Water Stress and Crop Plants**, 2016. DOI: 10.1002/9781119054450.ch3.

POGLIANI, L.; CERUTI, M.; RICCHIARDI, G.; VITERBO, D., An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 70, n. 1, p. 21-34, 1994.

POLSIN, A. F.; KWASNIEWSKI, J.; SCHAWARTZ, M. Controle de qualidade de espécie *Maytenus ilicifolia* – Celastraceae comercializados na cidade de União da Vitória-PR. **Journal of health**, v. 23, n. 1, 2020.

PRASAD, S.; PHROMNOI, K.; YADAV, V. R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Med.**, v. 76, n. 11, p. 1044-1063, 2010. DOI: 10.1055/s-0030-1250111.

PROTÁSIO, T. P.; BUFLALINO, L.; JUNIOR, M. G.; TONOLI, G. H. D.; TRUGILHO, P. F. Técnicas multivariadas aplicadas à avaliação de resíduos lignocelulósicos para a produção de bioenergia. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 4, p. 771–781, 2013. DOI: 10.5902/1980509812361.

QIAO, X.; HE, W. N.; XIANG, C.; HAN, J.; WU, L. J.; GUO, D. A.; YE, M. Qualitative and quantitative analyses of flavonoids in *Spirodela polyrrhiza* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Phytochem Anal.**, v. 22, n. 6, p. 475-483, 2011. DOI: 10.1002/pca.1303.

QIN, J.; FU, Y.; CHEN, X.; LIU, Y.; ZHAO, J.; ZUO, J.; LI, Y.; ZHU, W.; ZHAO, W.; Celamonols A–D, four triterpenoid and catechin conjugates with immunosuppressive activities from the stems of *Celastrus monospermus*. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 22, p. 3786-3792, 2019. DOI: 10.1039/C9QO00974D

QU, L.; CHEN, J.; ZHANG, G.; SUN, S.; ZHENG, J. Chemical profiling and adulteration screening of *Aquilariae Lignum Resinatum* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 177–182, 2017. DOI: 10.1016/j.saa.2016.11.008.

QUEIROZ, S. C. N.; MELO, L. F. C.; JARDIM, I. C. S. F. Poly (methyloctadecylsiloxane) immobilized on silica by radiation for use in solidphase extraction. **Journal Chromatography A**, v. 948, p. 171-176, 2002. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)01423-6.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; GANDHI, S.; PASSOS, F.; HEIMFARTH, L.; PEREIRA, E.; MONTEIRO, B.; SANTOS, K.; DUARTE, M.; NASCIMENTO, Y.;

TAVARES, J.; ABREU, L.; SOBRAL, M.; RODRIGUES, A.; COUTINHO, H.; NEVES DE LIMA, Á. A.; ZENGİN, G.; QUINTANS, J. Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI-/MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-6. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, a112938, 2020. DOI: 10.1016/j.jep.2020.

RADOMSKI, M. I. **Teores foliares de silício, taninos e lignina, em *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (Espinheira-Santa), em função de variáveis ambientais e genéticas**. 2006. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia) – UNESP, Botucatu – SP.

RADOMSKI, M. I.; BULL, L. T. Caracterização ecológica e fitoquímica de quatro populações naturais de *Maytenus ilicifolia* no Estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 61, p. 1-16, 2010.

RADUŠIENĖ, J.; KARPAVIČIENĖ, B.; STANIUS, Ž. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's worth. **Botanica Lithuanica**, v. 18, n. 2, p. 101-108, 2012. DOI: 10.2478/v10279-012-0012-8.

RADUŠIENĖ, J.; MARKSA, M.; IVANAUSKAS, L.; JAKŠTAS, V.; ÇALIŞKAN, O.; KURT, D.; ODABAŞ, M. S.; ÇIRAK, C. Effect of nitrogen on herb production, secondary metabolites and antioxidant activities of *Hypericum pruinatum* under nitrogen application. **Industrial Crops and Products**, v. 139, a111519, 2019. DOI: j.indcrop.2019.111519.

RAHEEM, D. J.; TAWFIKE, A. F.; ABDELMOHSEN, U. R.; EDRADA-EBEL, R.; FITZSIMMONS-THOSS, V. Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). **Sci Rep**, v. 9, 2547, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-38940-w.

RANA, P. S.; SAKLANI, P.; CHANDEL, C. Influence of Altitude on Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *Coleus forskohlii* Root Extracts. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 14, p. 43-52, 2020. DOI: 10.3923/rjmp.2020.43.52.

RAO, T. N. Validation of Analytical Methods. In: STAUFFER, M. T. **Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches**, IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.72087.

RAPOSO, F. Evaluation of Analytical Calibration Based on Least Squares Linear Regression for Instrumental Techniques: A Tutorial Review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167-185, 2016. DOI:10.1016/j.trac.2015.12.006

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous

guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, a115913, 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913.

RAVISANKAR, P.; NAVYA, C. N.; PRAVALLIKA, D.; SRI, D. N. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. **IOSR J Pharm.**, v. 5, n. 10, p. 7-19, 2015.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000100029

RICHARD, A. Botanique. Plantes Vasculaires. In: DE LA SAGRA, R. (ed.) **Histoire Physique, Politique et Naturelle L'ile de Cuba**, t. 10. Arthus Bertrand, Paris, 1845.

RIVERA-MONDRAGÓN, A.; ORTÍZ, O. O.; BIJTEBIER, S.; VLIETINCK, A.; APERS, S.; PIETERS, L.; CABALLERO-GEORGE, C. Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1500-1514, DOI: 10.1080/13880209.2017.1307421.

ROCHA, C. S. **Estudo comparativo farmacognóstico e atividade biológica de *Maytenus rigida* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastraceae)**. 2003. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE.

ROCHA, M. B.; SOUZA, F. V. M.; ESTEVAM, C. S.; PIZZA, C.; SANT'ANA, A. E. G.; MARÇAL, R. M. Antispasmodic effect of 4'-methylepigallocatechin on guinea pig ileum. **Fitoterapia**, v. 83, n. 7, p. 1286-1290, 2012. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.05.010.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848-55, 2012. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.07.001.

RODRIGUES, A. C. B.; OLIVEIRA, F. P.; DIAS, R. B.; SALES, C. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; EMMANOEL, V. C.; SILVA, F. M. A.; ROCHA, W. C.; KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 516-524, 2019. DOI:10.1016/j.jep.2018.11.008.

ROJO-POVEDA, O.; BARBOSA-PEREIRA, L.; MATEUS-REGUENGO, L.; BERTOLINO, M.; STÉVIGNY, C.; ZEPPA, A. G. Effects of Particle Size and Extraction Methods on Cocoa Bean Shell Functional Beverage. **Nutrients**, v. 11, n. 4, a867, 2019. DOI: 10.3390/nu11040867

ROZZA, A. L.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TANIMOTO, A.; PELLIZZON, C. H. Morphologic and Pharmacological Investigations in the Epicatechin Gastroprotective Effect. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 708156, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1155/2012/708156.

RUTKOWSKA, E., ŁOZOWICKA, B. & KACZYŃSKI, P. Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS. **Food Anal. Methods**, v. 11, p. 709–724, 2018. DOI: 10.1007/s12161-017-1047-3.

SÁ, R. R.; MATOS, R. A.; SILVA, V. C.; CALDAS, J. C.; SAUTHIER, M. A. S.; SANTOS, W. N. L.; MAGALHÃES, H. I. F.; JÚNIOR, A. F. S. Determination of bioactive phenolics in herbal medicines containing *Cynara scolymus*, *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss and *Ptychopetalum uncinatum* by HPLC-DAD. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 10-15, 2017. DOI: 10.1016/j.microc.2017.07.009.

SAÉZ, V.; RIQUELME, S.; BAER, D. V.; VALLVERDÚ-QUERALT, A. Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Molecules**, v. 24, n. 20, a3763, 2019. DOI: 10.3390/molecules24203763.

SAGWAN, S.; RAO, D. V.; SHARMA, R. A. In-vitro antioxidant activity of *Maytenus emarginata* (Willd.) using DPPH Assay. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 7, p. 2276-2278, 2011.

SAKLAR, S.; ERTAS, E.; OZDEMIR, I. S.; KARADENIZ, B., Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6639–6646, 2015.

SALAZAR, G. C. M., et al., Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: 1H and 13C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 977-980, 2000.

SANTCHURN, D.; RAMDOYAL, K., BADALOO, M. G. H.; LABUSCHAGNE, M. From sugar industry to cane industry: investigations on multivariate data analysis techniques in the identification of different high biomass sugarcane varieties. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 543-558, 2012. DOI: 10.1007/s10681-012-0682-4.

SANTOS, V. S.; COSTA, V. B. M.; AGRA, M. F.; SILVA, B. A.; BATISTA, L. M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) in animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 333-342, 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000300006.

SANTOS, V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; SILVA, B. A.; LIMA, M. S.; SOUZA, A. M. F.; BARBOSA, F. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de**

Plantas Medicinais, v. 13, n. 1, p. 68-72, 2011. DOI:10.1590/S1516-05722011000100010.

SANTOS, C. M. D.; KLASA, B. Sistemática filogenética hennigiana: revolução ou mudança no interior de um paradigma?. **Sci. stud.**, v. 10, n. 3, p. 593-612, 2012. DOI:10.1590/S1678-31662012000300008.

SANTOS, H. T. L.; OLIVEIRA, A. M. O.; MELO, P. G.; FREITAS, W.; FREIRAS, A. P. R. Chemometrics: Theory and Application. *In: FREIRAS, L. V.; FREITAS, A. P. R. Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*, IntechOpen, 2013. DOI: 10.5772/53866.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. M.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis*×*E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 120-127, 2012. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.02.003.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 938, p. 65-74, 2013. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.08.034.

SANTOS, R. O.; GORGULHO, B. M.; CASTRO, M. A.; FISBERG, R. M. MARCHIONI, D. M.; BALTAR, V. T. Principal Component Analysis and Factor Analysis: differences and similarities in Nutritional Epidemiology application. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, e190041, 2019. DOI: 10.1590/1980-549720190041.

SANTOS, V. A. F. F. M.; DIAS, N. B.; TEIXEIRA, S. P.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. Mapping Biochemical Pathways in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) through Integrated Proteomics and Histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 2, p. 237-248, 2021. DOI: 10.21577/0103-5053.20200173.

SASHIDHARA, K. V.; ROSAIAH, J. N. Various Dereplication Strategies Using LC-MS for Rapid Natural Product Lead Identification and Drug Discovery. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 2, p. 193-202, 2007. DOI: 10.1177/1934578X0700200218.

SASIREKHA, K.; BABY, P. Agglomerative Hierarchical Clustering Algorithm - A Review. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2013.

SCHINDLER, M. S. Z.; FROZZA, C.; ANZOLLIN, G.; CALISTO, J. F. F.; RADÜNZ, A. L.; MARIOT, M. P.; MAGRO, J. D.; ZANATTA, L. Phytochemical Characterization and In vitro Effects of Extracts Produced from Different *Maytenus ilicifolia* Matrices on the Activity of Intestinal Disaccharidases.

European Journal of Medicinal Plants, v. 31, n. 14, p. 32-44, 2020. DOI: 10.9734/ejmp/2020/v31i1430315.

SCHMIDT, P. C. & ORTEGA, G.G. Passionsblumenkraut. bestimmung des gesamtflavonoidgehaltes von Passiflorae herba. **Deutsche Apotheker Zeitung** v. 133, p. 17-26, 1983.

SCHRIPSEMA, J., Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 14-21, 2009.

SCHÜTZ, M. V.; VELAZQUEZ, C. C.; ABEGG, M. A. Avaliação da qualidade microbiológica das drogas vegetais mais comercializadas em farmácias de manipulação de Toledo –PR. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 12, n. 3, p. 181-186, 2008.

SCHWANZ, M. **Avaliação química e biológica de *Maytenus dasyclada* Mart. E *Maytenus cassineiformis* Reissek (Celastraceae)**. 2012. 228p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIOTENTINO, A., Chemical Composition and Seasonality of Aromatic Mediterranean Plant Species by NMR-Based Metabolomics. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

SERAFIM, C.; ARARUNA, M. E.; JÚNIOR, E. A.; DINIZ, M.; HIRUMA-LIMA, C.; BATISTA, L. A. Review of the Role of Flavonoids in Peptic Ulcer (2010-2020). **Molecules**, v. 25, n. 22, a5431, 2020. DOI: 10.3390/molecules25225431.

SETZER, W. N.; HOLLAND, M. T.; BOZEMAN, C. A.; ROZMUS, G. F.; SETZER, M. C.; MORIARITY, D. M. REEB, S.; VOGLER, B.; BATES, R. B.; HABER, W. A. Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. **Planta Med.**, v. 67, n. 1, p. 65-69, 2001. DOI: 10.1055/s-2001-10879.

SHAMLOO, M.; BABAWALE, E. A.; FURTADO, A.; HENRY, R. J.; ECK, P. K.; JONES, P. H. J. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. **Sci Rep**, v. 7, a9133, p. 1-13, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-09681-5.

SHAN, W.; ZHANG, L.; XIANG, J.; ZHAN, Z. Natural Friedelanes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1392-1434, 2013. DOI: 10.1002/cbdv.201100256.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santaf de Bogotá: Quebecor-Impreandes, 190p. 2000.

SHARIFI-RAD, M.; FOKOU, P.V.T.; SHAROPOV, F.; MARTORELL, M.; ADEMILUYI, A.O.; RAJKOVIC, J.; SALEHI, B.; MARTINS, N.; IRITI, M.; SHARIFI-RAD, J. Antiulcer Agents: From Plant Extracts to Phytochemicals in

Healing Promotion. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1-37, 2018.
 DOI:10.3390/molecules23071751

SHARMA, A. ; SHAHZAD, B. ; REHMAN, A. ; BHARDWAJ, R. ; LANDI, M. ; ZHENG, B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, 2019. DOI : 10.3390/molecules24132452.

SHARMA, A.; SABHARWAL, P.; DADA, R. Herbal medicine - An introduction to its history. **Herbal Medicine in Andrology**, n. 1, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-815565-3.00001-1.

SHI, M. ; NIE, Y. ; ZHENG, X-Q. ; LU, J-L. ; LIANG, Y-R. ; YE, J-H. Ultraviolet B (UVB) Photosensitivities of Tea Catechins and the Relevant Chemical Conversions. **Molecules**, v.21, n. 10, a1345, 2016. DOI : 10.3390/molecules21101345

SHI, B.; ZHANG, W.; LI, X.; PAN, X. Seasonal variations of phenolic profiles and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata* Dode) green husks. **International Journal of Food Properties**, v. 20, s. 3, p. S2635-S2646, 2018. DOI: 10.1080/10942912.2017.1381706.

SILVA, J. L.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; FATIMA SILVA, G. D.; VIEIRA FILHO, S. A.; FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 30-35, 2005.

SILVA, M. S.; SOUSA, D. P.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M., Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

SILVA, G. D. F.; SILVA, S. R. S.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; VIEIRA FILHO, S. A.; OLIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart. Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 530-536, 2009.

SILVA, F. C.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; MIRANDA, R. R. S.; FIILHO, S. A. V. A New Friedelane Triterpenoid from the Branches of *Maytenus Gonoclada* (Celastraceae). **Journal of Chemical Research**, v. 35, n. 10, p. 555-557, 2011. DOI: 10.3184/174751911X13161944590173.

SILVA, A. J.; COSTA, R. S.; MARIANO, A. S.; SILVA, K. L. S.; JORDÃO, C. O., Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 93, n. 4, p. 457-462, 2012.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1205-1220, 2014. DOI: 10.5935/1984-6835.20140079.

SILVA, T. M. **Análise genotóxica e antibacteriana de frações e isolados de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae)**. 2016. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia). Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; FAIAL, K. C. F.; MENDONÇA, M. S. Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 27, n. 1, p. 20-33, 2017. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.07.006.

SILVEIRA, R. S.; LEAL, G. C.; MOLIN, T. R. D.; FACCIN, H.; GOBO, L. A.; SILVEIRA, G. D.; SOUZA, M. T. S.; LAMEIRA, O. A.; CARVALHO, L. M.; VIANA, C. Determination of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypiifolia* L by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, a17262, 2020. DOI: 10.1590/s2175-97902019000417262

SIMIRGIOTIS, M. J.; BENITES, J.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490-11507, 2015. DOI: 10.3390/molecules200611490.

SIMMONS, M. P.; BACON, C. D.; CAPPA, J. J.; MCKENNA, M. J. Phylogeny of Celastraceae Subfamilies Cassinoideae and Tripterygioideae Inferred from Morphological Characters and Nuclear and Plastid Loci. **Systematic Botany**, v. 37, n. 2, p. 456-467, 2012. DOI: 10.1600/036364412X635502.

SINGH, I.; JUNEJA, P.; KAUR, B.; KUMAR, P. Pharmaceutical applications of chemometric techniques. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, a795178, p. 1-14, 2013. DOI: 10.1155/2013/795178.795178.

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

SMYTH, W.; SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V. N.; O'DONNELL, F.; BROOKS, P. Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MSn. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 46-54. DOI: 10.1016/j.trac.2011.09.015.

SPENCER, J. P.; SCHROETER, H.; RECHNER, A. R.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. **Antioxid Redox Signal.**, v. 2, n. 6, p. 1023-1039, 2001. DOI: 10.1089/152308601317203558.

SPICER, R.; SALEK, R. M.; MORENO, P.; CANEUTO, D.; STEINBECK, C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, p. 106-122, 2017. DOI: 10.1007/s11306-017-1242-7.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.163.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant in vitro properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: A relation to their phenolic composition. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 595-605, 2018. DOI: 10.1016/j.jff.2017.12.002.

SPITALER, R.; SCHLORHAUFER, P. D.; ELLMERER, E. P.; MERFORT, I.; BORTENSCHLAGER, S.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 409-417, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.11.018.

SMART, D. J.; AHMEDI, K. P.; HARVEY, J. S.; LYNCH, A. M., Genotoxicity screening via the H2AX by flow assay. **Mutation Research**, v. 715, p. 25–31, 2011.

SOARES, L. A.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J Pharm Biomed Anal**, v. 36, p. 787-790, 2004.

SOMENSI, L. B.; COSTA, P.; BOEING, T.; MARIANO, L. N. B.; LONGO, B.; MAGALHÃES, C. G.; DUARTE, L. P.; MACIEL, A. T.; SOUZA, P.; ANDRADE, S. F.; SILVA, L. M. Gastroprotective properties of Lupeol-derived ester: Pre-clinical evidences of Lupeol-stearate as a potent antiulcer agente. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, 2020. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.108964.

SOUSA, D. P. **Fitoquímica das raízes de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) e caracterização de sua atividade no sistema nervoso central**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. New Triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural Elucidation Based on NMR Experimental Data and Theoretical Calculations. **Molecules**, v. 17, p. 13439-13456, 2012. DOI: 10.3390/molecules171113439.

SOUSA, G. F.; AGUILAR, M. G.; TAKAHASJO, J. A.; ALVES, T. M. A.; KOHLHOFF, M.; FILHO, S. A. V.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P. Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus robusta* with acetylcholinesterase

inhibition. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 34-38, 2017. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.10.024.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000300023.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais em mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 800p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 957 p.

SPARG, S.G. ; LIGHT, M.E. ; VAN STADEN, J., Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.

STAFFORD, H. A., **Pathway to proanthocyanindins (condensed tannins), flavan-3-ols, and unsubstituted flavans**. New York: CRC Press, p. 63–99, 1990.

ŠUKOVIĆ, D.; KNEŽEVIĆ, B.; GAŠIĆ, U.; SREDOJEVIĆ, M.; ĆIRIĆ, I.; TODIĆ, S.; MUTIĆ, J.; TEŠIĆ, Ž. Phenolic Profiles of Leaves, Grapes and Wine of Grapevine Variety Vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. **Foods**, v. 9, n. 2, a138, 2020. DOI: 10.3390/foods9020138.

SUMBUL, S.; AHMAD, M. A.; MOHD, A.; MOHD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 3, n. 3, p. 361–367, 2011. DOI: 10.4103/0975-7406.84437.

SUN, J.; LIU, W.; ZHANG, M.; GENG, P.; SHAN, Y.; LI, G.; ZHAO, Y.; CHEN, P. The analysis of phenolic compounds in daylily using UHPLC-HRMSn and evaluation of drying processing method by fingerprinting and metabolomic approaches. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, a13325, 2018. DOI: 10.1111/jfpp.13325.

SUN, K.; SU, C.; LI, W.; GONG, Z.; SHA, C.; LIU, R. Quality markers based on phytochemical analysis and anti-inflammatory screening: An integrated strategy for the quality control of *Dalbergia odorifera* by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS.

Phytomedicine, v. 84, 153511, p. 1 – 12, 2021. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153511.

SZAKIEL, A.; PĄCZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochem Rev**, v. 10, p. 471–491, 2011. DOI: 10.1007/s11101-010-9177-x.

TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A., Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I – Preclinical Studies. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 915–920, 2017.

TAKAMI, S.; IMAI, T.; HASUMURA, M.; CHO, Y. M.; ONOSE, J.; HIROSE, M. Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 6, p. 2224-9, 2008. DOI: 10.1016/j.fct.2008.02.023.

TRIBA, M. N.; LE MOYEC, L.; AMATHIEU, R.; GOOSSENS, C.; BOUCHEMAL, N.; NAHON, P.; RUTLEDGE, D. N.; SAVARIN, P. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Mol Biosyst**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2015. DOI: 10.1039/c4mb00414k.

TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytol**, v. 163, p. 547-561, 2004. DOI: 10.1111/j.1469-4938137.2004.01126.x.

TÁVORA, F. J. A.; LIMA, E. C. C.; HERNANDEZ, F. F. F. Mineral composition of roots, stems and leaves of young soursop plants under saline stress. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n.1, p. 44 – 51, 2004.

TAWFIKE, A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and dereplication strategies in natural products. **Methods Mol Biol**, vol. 1055, p. 227-244, 2013. DOI:10.1007/978-1-62703-577-4_17.

TEBOU, P. L. F.; TAMOKOU, J. D.; NGNOKAM, D.; VOUTQUEENNE-NAZABADIOKO, L.; KUIATE, J. R.; BAG, P. K. Flavonoids from *Maytenus buchananii* as potential cholera chemotherapeutic agentes. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 58-65, 2017. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.12.019.

THEODORSSON, E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. **Bioanalysis**, v. 4, n. 3, p. 305-320, 2012 DOI: 10.4155/bio.11.311.

THOA, N. T.; DANG, N. H.; GIANG, D. H.; MINH, N. T. T.; DAT, N. T. Metabolomics Approach for Discrimination and Quality Control of Natural and Commercial *Fallopia multiflora* Products in Vietnam. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2020, Article ID 8873614, 2020. DOI: 10.1155/2020/8873614.

TOHGE, T.; PEREZ DE SOUZA, L.; FERNIE, A. R. On the natural diversity of phenylacylated-flavonoid and their in planta function under conditions of stress. **Phytochem Rev**, V. 17, p. 279–290, 2018. DOI: 10.1007/s11101-017-9531-3.

TRIPATHY, V.; SAHA, A.; KUMAR, J. Detection of pesticides in popular medicinal herbs: a modified QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry-based approach. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 2, p. 458–468, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2487-x.

TRIVEDI, D. K; ILES, R. K. The application of SIMCA P+ in shotgun metabolomics analysis of ZIC®HILIC-MS spectra of human urine –experience with the Shimadzu IT-TOF and profiling solutions data extraction software. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v. 3, p. 1-5, 2012. DOI: 10.4172/2157-7064.1000145.

TULLIS, T.; ALBERT, B. Chapter 9 - Special Topics. In: KAUFMANN, M. (ed) **Interactive Technologies, Measuring the User Experience**. 2nd ed., p. 209-236, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-415781-1.00009-1.

UPADHYAY, P.; JOSHI, B. C.; SUNDRIYAL, A.; MUKHIJA, M. Pharmacognostic standardization and physicochemical evaluation of *Caesalpinia crista* L. root for quality control assessment. **J Nat Sci Med**, v. 2, p. 135-140, 2019. DOI: 10.4103/JNSM.JNSM_61_18.

UPADHYE, A.; LOURELLE DIAS, G. P.; DATAR, P.; DATAR, M. Pharmacognostic evaluation of stem and root of *Salacia oblonga* Wall. **International Journal of Pharma and Chemical Research**, v. 5, n. 2, p. 34-39, 2019.

USP - UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. **Validation of Compendial Methods, USP-26-NF21**, 2003.

USP - UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. **Validation of compendial procedures**, USP 41-NF 36, chapter <1225>. United States Pharmacopoeia: North Bethesda, 2018.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 24, n. 5-6, p. 723-753, 2001. DOI: 10.1016/s0731-7085(00)00529-x.

VARELA, M. C.; ARSLAN, I.; REGINATO, M. A.; CENZANO, A. M.; LUNA, V. Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina), **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p 81-91, 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.03.014.

VASCONCELOS, E. A. F.; BARBOSA, R. M.; MEDEIROS, M. G. F.; MOURA, T. F. A. Influence of Extractive Process, Solvent and Particle Size of Plant Material on the Total Solids Content of *Schinus terebinthifolius* Raddi Extractive Solutions. **Revista Fitos**, p. 74-79, 2005.

VÁSQUEZ-OCMÍN, P.; COJEAN, S.; ENGIJO, E.; SUYYAGH-ALBOUZ, S.; GUERRA, C. A. A.; POMEL, S.; CABANILLAS, B.; MEJIA, K.; LOISEAU, P. M.; FIGADÈRE, B.; MACIUK, A. Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 372-385, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017.08.039.

VELOSO, C. C.; SOARES, G. L.; PEREZ, A. C.; RODRIGUES, V. G.; SILVA, F. C. Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 533-540, 2017. DOI: 10.1016/j.bjp.2017.02.006

VELOSO, L. L. S. A. **Produção de mudas de gravioleira irrigadas com águas de distintas salinidades e doses de nitrogênio**. 2017. 73p. Dissertação (Mestrado em Horticultura Tropical) – Universidade Federal de Campina Grande, Pombal-PB.

VELOSO, C. C.; OLIVEIRA, M. C.; RODRIGUES, V. C.; OLIVEIRA, C. C.; DUARTE, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, A. V. M.; PEREZ, A. C. Evaluation of the effects of extracts of *Maytenus imbricata* (Celastraceae) on the treatment of inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 539-548, 2019. DOI:10.1007/s10787-018-0496-7.

VIEIRA, A. M. **Eficácia do extrato aquoso de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: análise do envolvimento de óxido nítrico, prostaglandinas, receptores opioides e α-2-adrenérgicos**. 2013. 80p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, Sobral-CE.

VUUREN, S. V.; WILLIAMS, V. L.; SOOKA, A.; BURGER, A.; HAAR, L. V. Microbial contamination of traditional medicinal plants sold at the Faraday muthi market, Johannesburg, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 94, p. 95-100, 2014. DOI: 10.1016/j.sajb.2014.06.002.

XIAOHUI, F.; YI, W.; YIYU, C. LC/MS fingerprinting of Shenmai injection: A novel approach to quality control of herbal medicines, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 591-597, 2006. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.10.036.

WANG, R.; ZHOU, W.; WEN, R. H., Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5924–5932, 2006.

WANG, H. X.; YANG, T. W.; LI, J. Y. Effects of enhanced UV-B radiation on leaf anthraquinones content and cell ultrastructure of *Aloe vera* L. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v. 21, n. 1, p. 260-264, 2010.

WANG, L.Y.; WEI, K.; JIANG, Y.W.; CHENG, H.; ZHOU, J.; HE, W.; ZHANG, C.C. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). **Eur. Food Res. Technol.**, v. 233, p. 1049–1055, 2011. DOI: 10.1007/s00217-011-1588-4.

WANG, Y.; SIEMANN, E.; WHEELER, G. S.; ZHU, L.; GU, X.; DING, J., Genetic variation in anti-herbivore chemical defences in an invasive plant. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 4, p. 894–904, 2012.

WANG, C. M.; LI, T. C.; JHAN, Y. L.; WENG, J. H.; CHOU, C. H. The Impact of Microbial Biotransformation of Catechin in Enhancing the Allelopathic Effects of *Rhododendron formosanum*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, e85162, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085162>.

WANG, Y. S.; XU, Y. J.; GAO, L. P.; YU, O.; WANG, X. Z.; HE, X. J.; JIANG, X. L.; LIU, Y. J.; XIA, T. Functional analysis of flavonoid 3',5'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins. **BMC Plant Biol.**, v. 14, a347, 2014. DOI: 10.1186/s12870-014-0347-7.

WANG, M.; CAO, A.; OUYANG, C.; LI, Y.; WEI, Y. Rapid screening and identification of non-target flavonoid components in invasive weeds by LC/MS-IT-TOF. **Analytical Methods**, v. 7, n. 24, p. 10207-16, 2015. DOI: 10.1039/C5AY02186C.

WANG, J.; LI, J.; LI, J.; LI, J.; LIU, S.; HUANG, L.; GAO, W. Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 2, p. 115-125, 2017. DOI: 10.1016/S1674-6384(17)60085-6.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Wiley, 248p, 1994.

WEI, K. ; WANG, L. ; ZHOU, J. ; HE, W. ; ZENG, J. ; JIANG, Y. ; CHENG, H. Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. **Food Chemistry**, v. 125, p. 44–48, 2011.

WEI, A. M. ; AL-BURTAMANI, R. S. ; AL-AZZAWI, M. S. ; AKHTAR, M. S. ; SAID, S. A. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of *Maytenus dhofarensis* Growing in Oman. **Journal of Applied Sciences**, v. 19, p. 229-234, 2019. DOI: 10.3923/jas.2019.229.234.

WELLMANN, F.; GRIESSE, M.; SCHWAB, W. ; MARTENS, S. ; EEISENREICH, W. ; MATERN, U., Anthocyanidin synthase from *Gerbera* hybrid catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin. **FEBS Letters**, v. 580, n. 6, p. 1642–1648, 2006.

WHO – World Health Organization. **Quality control methods for herbal materials**. WHO Press, Geneva, p. 1-173, 2011. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44479>.

WHO – World Health Organization. **Guidelines for selecting marker substances of herb origin for quality control of herbal medicines.** WHO Press, Geneva, p. 1-16, 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23240en/s23240en.pdf>.

WHO – World Health Organization. **Guidelines on validation - Appendix 4 - Analytical method Validation;** Geneva, p. 1-11, 2018. Disponível em : https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/28092018Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidation-Appendix4_QAS16-671.pdf

WIBOWO, M.; LEVRIER, C.; SADOWSKI, M. C.; NELSON, C. C.; WANG, Q.; HOLST, J.; HEALY, P. C.; HOFMANN, A.; DAVIS, R. A. Bioactive Dihydro- β -agarofuran Sesquiterpenoids from the Australian Rainforest Plant *Maytenus bilocularis*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 5, p. 1445-1453, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00190

WOJAKOWSKA, A.; MUTH, D.; NAROZNA, D.; MADRZAK, C.; STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Changes of phenolic secondary metabolite profile in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupinifungus* or treatment with its toxin. **Metabolomics**, v. 9, p. 575–589. 2013. DOI: 10.1007/s11306-012-0475-8.

WOLFENDER, J.-L.; ALLARD, P.-M.; KUBO, M.; QUEIROZ, E.F. Metabolomics Strategies for the Dereplication of Polyphenols and Other Metabolites in Complex Natural Extracts. In: HALBWIRTH, H.; STICH, K.; CHEYNIER, V.; QUIDEAU, S. (eds) **Recent Advances in Polyphenol Research**. 1 ed. v. 6, John Wiley & Sons:West Sussex, UK, p. 183-205, 2019. DOI: 10.1002/9781119427896.ch7.

WONFOR, R.; NATOLI, M.; PARVEEN, I.; BECKMAN, M.; NASH, R.; NASH, D. Anti-inflammatory properties of an extract of *M. ilicifolia* in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 283-287, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.08.006.

YAMASHITA, H.; MATSUZAKI, M.; KUROKAWA, Y.; NAKANE, T.; GOTO, M.; LEE, K.; SHIBATA, T.; BANDO, T.; WADA, K. Four new triterpenoids from the bark of *Euonymus alatus* forma *ciliato-dentatus*. **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 140-146, 2019. DOI: 10.1016/j.phytol.2019.03.015.

YANG, S.; LI, J.; ZHAO, Y.; CHEN, B.; FU, C. Harpagoside Variation Is Positively Correlated with Temperature in *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1612-1621, 2011. DOI: 10.1021/jf104702u.

YANG, L.; WEN, K. S.; RUAN, X.; ZHAO, Y. X.; WEI, F.; WANG, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/molecules23040762.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C., Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 162-168, 2005.

YOSHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; INOUE, K.; NAKAE, D.; NISHIKAWA, A. Lack of chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administrated catechin mixture in Wistar Hannover GALAS rats. **J Toxicol Sci**, v. 36, n. 3, p. 297-311, 2011. DOI: 10.2131/jts.36.297.

YOKOTA, A.; JACOMASSI, E.; JUNIOR, A.; TAKEMURA, O. Avaliação da qualidade de produtos contendo *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae (espinheira-santa) comercializados na cidade de Umuarama – PR. **Serina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 159-168, 2010. DOI: 10.5433/1679-0367.2010v31n2p159.

YU, Z.; LIAO, Y.; DONG, F.; WATANABE, N.; YANG, Z. Transformation of catechins into theaflavins by upregulation of CsPPO3 in preharvest tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to shading treatment. **Food Research International**, v. 129, a108842, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108842.

YULIANI, S. H.; AJI, P.; SANDRAPITALOKA, A.; RESTIANA, F.; GANI, M. R.; RISWANTO, F. D. O. Effects of Particle Size, Extraction Time, and Solvent Selection on Daidzein Extracted Amount from Tempeh - A Fermented Product of Soybean. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Community**, v. 16, n. 1, p. 44-49, 2019. DOI: 10.24071/jpsc.001794.

ZANGUEU, C. B.; OLOUNLADE, A. P.; OSSOKOMACK, M.; DJOUATSA, Y. N. N.; ALOWANOU, G. G.; AZEBAZE, A. G. B.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; DE CÓRDOVA, M. L. F.; DONGMO, A. B.; HOUNZANGBE-ADOTE, M. S. In vitro effects of aqueous extract from *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell stem bark on egg hatching, larval migration and adult worms of *Haemonchus contortus*. **BMC Vet Res.**, v. 14, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s12917-018-1475-3.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W. S. M.; FÁVERO, M. L. D.; CORRÉA JÚNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 29-39, 2004. DOI:10.1590/S0102-695X2004000100005.

ZERMIANI, T.; JUNIOR, A. A.; FERREIRA, R. A.; WAGNER, T. M.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Seasonal variation of gastroprotective terpenoids in *Maytenus robusta* (Celastraceae) quantified by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). **Z Naturforsch C J Biosci.**, v. 71, n. 11-12, p. 369-373, 2016. DOI: 10.1515/znc-2015-0185.

ZHANG, W. J.; BJÖRN, L. O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. **Fitoterapia**, v. 80, n. 4, p 2017-218, 2009. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.02.006.

ZHANG, S.; WEI, F.; FAN, Y.; SUN, F.; ZHAO, Y.; BAI, S. Quality Control of Natural Product Medicine and Nutrient Supplements. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, Article ID 182573, 2013.
DOI:10.1155/2013/182573.

ZHANG, Q.; LIU, M.; RUAN, J. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. **BMC Plant Biol**, v. 17, n.1, a64, 2017. DOI: 10.1186/s12870-017-1012-8.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chin Med**, v. 13, n. 20, 2018. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x.

ZHAO, H. Y.; FAN, M. X.; WU, X.; WANG, H. J.; YANG, J.; SI, N.; BIAN, B. L. Chemical profiling of the Chinese herb formula Xiao-Cheng-Qi Decoction using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **J Chromatogr Sci**., v. 51, n. 3, p. 273-285, 2013. DOI: 10.1093/chromsci/bms138.

ZHAO, J.; MA, S.; LI, S. Advanced strategies for quality control of Chinese medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 473-478, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.06.048.

ZHAO, Q.; BI, Y.; ZHONG, J.; REN, Z.; LIU, Y.; JIA, J.; YU, M.; TAN, Y.; ZHANG, Q.; YU, X. Pristimerin suppresses colorectal cancer through inhibiting inflammatory responses and Wnt/β-catenin signaling. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 386, p. 1-15, 2020. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114813.

ZHAO, Q.; BI, Y. GUO, J.; LIU, Y.; ZHONG, J.; LIU, Y.; PAN, L.; GUO, Y.; TAN, Y.; YU, X. Effect of pristimerin on apoptosis through activation of ROS/endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated noxa in colorectal cancer. **Phytomedicine**, v. 80, 2021, DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153399.

ZHENG, W.-H.; BAI, H.-Y.; HAN, S.; BAO, F.; ZHANG, K.-X.; SUN, L.-L.; DU, H.; YANG, Z.-G. Analysis on the Constituents of Branches, Berries, and Leaves of *Hippophae rhamnoides* L. by UHPLC-ESI-QTOF-MS and Their Anti-Inflammatory Activities. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 8, 2019. DOI: 10.1177/1934578X19871404.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1266–1271, 2007.

ZHOU, W.; YANG, S.; WANG, P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. **Bioanalysis**, v. 9, n. 23, p. 1839-1844, 2017. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.

ZHOU, C.; LUO, Y.; LEI, Z.; WEI, G. UHPLC-ESI-MS Analysis of Purified Flavonoids Fraction from Stem of *Dendrobium denneaeum* Paxt. and Its

Preliminary Study in Inducing Apoptosis of HepG2 Cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2018, a8936307, 2018. DOI: 10.1155/2018/8936307.

ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae: Trends and causes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 197-203, 2010. DOI: 10.1007/s11101-009-9143-7.

APÊNDICE A

Validação de metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais

A.1 Execução dos testes de validação analítica

A.1.1 Especificidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de três tipos de amostras:

Amostra 1: Controle positivo tipo 1 (Solução Padrão).

Amostra 2: Controle positivo tipo 2 (Amostra – EEB Setembro/2017).

Amostra 3: Controle negativo 1 (Solvente)

Amostra 4: Controle negativo 2 (Solução de cloreto de alumínio 2,5%)

A.1.1.2 Procedimento

a) Preparo da solução padrão

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg da substância química de referência da Quercetina. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 5,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1).

Para análise da amostra 1 (controle positivo – solução padrão), foi pipetado 1 mL da (S1) e transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução padrão = 100 µg de
Quercetina/mL

b) Preparo da solução amostra

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia* referente ao mês de Setembro de 2017. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 8,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1a).

Concentração final da solução amostra = 1 mg/mL do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia*

Para avaliação do parâmetro especificidade, 100 μ L das soluções referentes às amostras 1, 2, 3 e 4 foram tratadas com 100 μ L da solução de cloreto de alumínio (2,5%) e submetidas à incubação ao abrigo da luz por 30 minutos. As amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 425 nm.

A.1.2 Linearidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de 5 soluções da substância química de referência (Quercetina), com uso de padrão externo, nas seguintes concentrações: 10, 20, 100, 150, 250 μ g/mL. Estas foram obtidas, por meio de diluições, em triplicata, a partir de uma solução estoque, resultando em 15 soluções padrões para análise.

a) Solução Padrão (Solução mãe)

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg da substância química de referência da Quercetina. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 5,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1).

Concentração final da solução estoque (S1) = 1000 μ g de Quercetina/mL

Preparo das soluções:

a) 10 μ g/mL: pipetou-se 100 μ L da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 10 μ g/mL;

b) 20 μ g/mL: pipetou-se 200 μ L da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 20 µg/mL;

c) 100 µg/mL: pipetou-se 1000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 100 µg/mL;

d) 150 µg/mL: pipetou-se 1500 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 150 µg/mL;

e) 250 µg/mL: pipetou-se 2500 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 250 µg/mL;

Após o preparo das amostras para análise, 100 µL das soluções (10-250 µg/mL) foram tratadas com 100 µL da solução de cloreto de alumínio (2,5%) e submetidas à incubação ao abrigo da luz por 30 minutos. As amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 425 nm.

A.1.3 Precisão (repetibilidade) e Precisão intermediária

a) Preparo da solução amostra

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia* referente ao mês de Setembro de 2017. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 8,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1a).

Concentração final da solução amostra = 1 mg/mL do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia*

Para avaliação do parâmetro precisão, 100 µL das soluções referentes às amostras foram tratadas com 100 µL da solução de cloreto de alumínio (2,5%) e submetidas à incubação ao abrigo da luz por 30 minutos. As amostras foram

distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 425 nm.

A.1.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de 6 determinações a 100% da concentração do teste com o mesmo analista e mesma instrumentação. Para avaliação da precisão foram preparadas 3 soluções mãe conforme item 1.3.a, e a leitura foi realizada em triplicata. Os resultados foram avaliados considerando a absorbância referente ao ativo Quercetina, e o coeficiente de variação percentual relativo a seis repetições, com critério de aceitação para o coeficiente de variação $\leq 5\%$.

A.1.3.2 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária foi realizada por um segundo analista, no dia seguinte da repetibilidade, que preparou seis determinações a 100% da concentração do teste, utilizando a mesma instrumentação e método analítico. Os resultados foram avaliados considerando a absorbância referente ao ativo Quercetina e o coeficiente de variação percentual, relativo a seis repetições, com critério de aceitação para o coeficiente de variação $\leq 5\%$.

A.1.4 Exatidão

Para avaliar esse parâmetro foram preparadas 3 amostras, em triplicata, nas concentrações 50, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (total de 9 amostras). Foi utilizada a metodologia por adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de analito (padrão de referência – Quercetina) à solução da amostra (extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*).

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação da solução de Quercetina, adicionada às amostras de solução do extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*. O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de uma solução contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Quercetina à solução amostra do extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*, conforme descrito abaixo.

A solução padrão foi preparada conforme o item A.1.2.a (. A solução amostra foi preparada conforme o item A.1.1.2.b.

A.1.4.1 Exatidão 50 µg/mL

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 250 µL da solução amostra e 25 µL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução= 50 µg de equivalentes de Quercetina/mL

A.1.4.2 Exatidão 100 µg/mL

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 250 µL da solução amostra e 75 µL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução = 100 µg de equivalentes de Quercetina/mL

A.1.4.3 Exatidão 250 µg/mL

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 250 µL da solução amostra e 225 µL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução = 250 µg de equivalentes de Quercetina/mL

O critério de conformidade será de 90 a 110 % de recuperação.

A.1.5 Robustez

Esse parâmetro foi realizado com 04 variações na metodologia analítica na concentração de 100% da concentração teórica da amostra e padrão, descritas na Tabela A.1.

Tabela A.1 – Descrição dos parâmetros avaliados na robustez do da metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais.

Parâmetros	Condições do método	Variações	
Tempo de Leitura das Amostras	Após 30 min	20 min	40 min

Comprimento de onda	425 nm	410 nm	440 nm
Concentração da solução AlCl ₃	2,5 %	2 %	3 %
Solventes	Metanol Merck® Ref. 1.06007.4000 Lote I722807 402	Metanol Tedia® Ref. Me1122-002 Lote 190806654	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A.2 Resultados da validação analítica

A.2.1 Especificidade

Tabela A.2 – Resultados obtidos na avaliação do parâmetro especificidade.

Soluções avaliadas	Absorbância	Concentração (μg EQ/mg de extrato)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Padrão	0,803	99,98	99,98	0,47	0,47
	0,799	99,51			
	0,807	100,44			
Amostra	0,797	99,27	100,64	1,20	1,19
	0,813	101,15			
	0,816	101,50			
Solvente	0,001	0,000	0,00	0,00	0,00
	0,000	0,000			
	0,000	0,000			
Solução de Cloreto de Alumínio (2,5%)	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00
	0,000	0,000			
	0,000	0,000			

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para doseamento flavonoides totais no extrato etanólico bruto (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* é específico, pois não apresentou interferência nos testes de especificidade determinados (controles negativos).

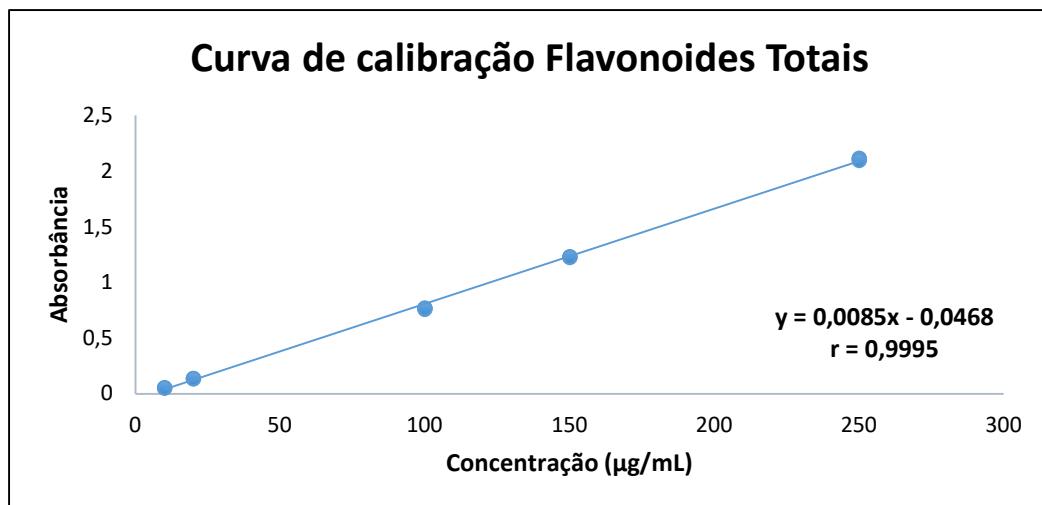
A.2.2 Linearidade

Tabela A.3: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador Quercetina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Absorbância	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
(10 µg/mL)	1	0,056	0,054	11,86 µg/mL	3,70
	2	0,052			
	3	0,054			
(20 µg/mL)	1	0,136	0,138	21,76 µg/mL	1,11
	2	0,139			
	3	0,138			
(100 µg/mL)	1	0,760	0,766	95,58 µg/mL	0,67
	2	0,770			
	3	0,767			
(150 µg/mL)	1	1,230	1,229	150,09 µg/mL	0,22
	2	1,226			
	3	1,231			
(250 µg/mL)	1	2,107	2,107	253,39 µg/mL	0,43
	2	2,116			
	3	2,098			

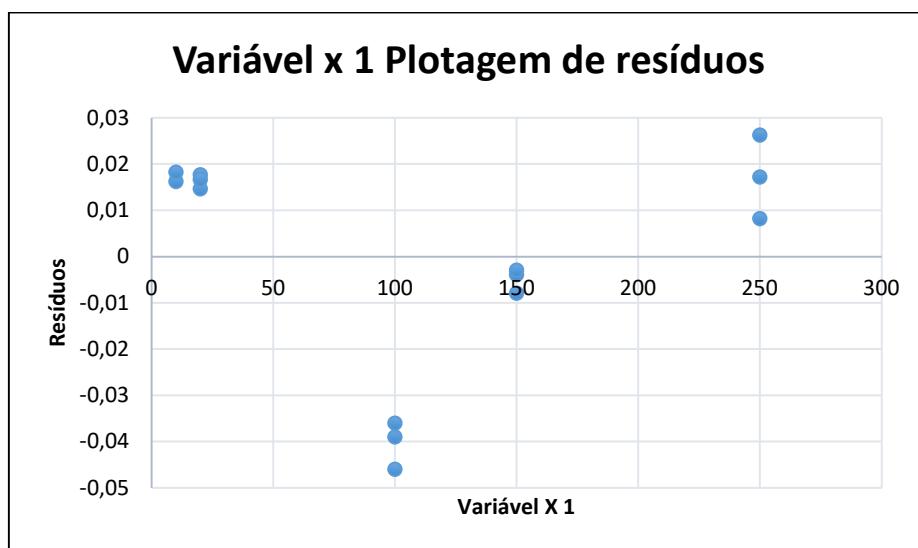
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico A.1: Regressão linear da curva de calibração (10 – 250 µg/mL) para o marcador Quercetina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico A.2: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador Quercetina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para o doseamento do teor de flavonoides totais nos extratos etanólicos brutos de *Monteverdia obtusifolia* é **linear**, pois o marcador apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99, estando semelhante ao valor estabelecido pela resolução (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017). Também na avaliação estatística ANOVA observou-se que $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, indicando que há correlação linear estatística entre os dados, ou seja, a equação linear proposta é adequada para descrever os dados experimentais, uma vez que os valores observados experimentalmente não diferem daqueles previstos pela equação. Os dados da regressão estão detalhados nas Tabelas A4 e A5.

Tabela A.4: Análise estatística de regressão da curva de calibração (10 – 250 µg/mL) para o marcador Quercetina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999528157
R-Quadrado	0,999056537
R-quadrado ajustado	0,998977915
Erro padrão	0,024960494
Observações	14

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	7,916855685	7,916855685	12707,1	1,59161E-19
Resíduo	12	0,007476315	0,000623026		
Total	13	7,924332			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,04987576	0,010859042	-4,593016551	0,000618	-0,07353558	-0,02621594	-0,07353558	-0,02621594
	0,008558393	7,59222E-05	112,7257644	1,59E-19	0,008392972	0,008723813	0,008392972	0,008723813

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela A.5: Resultados dos resíduos da análise de regressão da curva de calibração (10 – 250 µg/mL) para o marcador Quercetina.

Observação	Previsto(a)	Resíduos	Resíduos padrão
1	0,035708168	0,016291832	0,679356598
2	0,035708168	0,018291832	0,762755028
3	0,121292096	0,014707904	0,61330804
4	0,121292096	0,017707904	0,738405684
5	0,121292096	0,016707904	0,696706469
6	0,805963521	-0,045963521	-1,916642738
7	0,805963521	-0,035963521	-1,49965059
8	0,805963521	-0,038963521	-1,624748234
9	1,233883162	-0,003883162	-0,161924786
10	1,233883162	-0,007883162	-0,328721646
11	1,233883162	-0,002883162	-0,120225571
12	2,089722443	0,017277557	0,720460582
13	2,089722443	0,026277557	1,095753516
14	2,089722443	0,008277557	0,345167648

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A.2.3 Precisão

Tabela A.6: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrida para o doseamento de flavonoides totais realizado pelo Analista 1.

	Repetição	Concentrações	
		Absorbância	(µg EQ/mg de extrato)
Analista 1	1	0,807	100,45
	2	0,817	101,62
	3	0,813	101,15
	4	0,822	102,21
	5	0,808	100,56
	6	0,812	101,04
		Média	101,17
		DP	0,66
		DPR (%)	0,66

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela A.7: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrida para o doseamento de flavonoides totais realizado pelo Analista 2.

Repetição	Concentrações	
	Absorbância	(μ g EQ/mg de extrato)
Analista 2	1	0,798
	2	0,802
	3	0,809
	4	0,811
	5	0,804
	6	0,814
Média		100,37
DP		0,31
DPR (%)		0,706

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela A.8: Dados obtidos no parâmetro Precisão intercorrida para o doseamento de flavonoides totais realizado pelos Analistas 1 e 2.

Repetição	Áreas	Concentrações	
		($\mu\text{g EQ/mg de extrato}$)	
1	0,807	100,45	
2	0,817	101,62	
<i>Analista</i>	3	0,813	101,15
1	4	0,822	102,21
	5	0,808	100,56
	6	0,812	101,04
	1	0,798	99,39
	2	0,802	99,86
<i>Analista</i>	3	0,809	100,68
2	4	0,811	100,92
	5	0,804	100,09
	6	0,814	101,27
	Média	100,77	
	DP	0,78	
	DPR (%)	0,77	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para o doseamento do teor de flavonoides totais nos extratos etanólicos brutos de *Monteverdia obtusifolia* é **preciso**, pois apresenta desvios padrões inferiores a 5%, tanto para a precisão intra-corridas quanto para precisão intercorridas (BRASIL, 2003). Os dados obtidos na precisão foram submetidos ao teste t de Student, onde foi possível observar que o $t_{\text{calculado}}$ ($t=0,070$) < $t_{\text{crítico}}$ (2,228) para o doseamento de flavonoides totais demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas entre os dois dias.

A.2.4 Exatidão

Tabela A.9: Dados do parâmetro Exatidão para o doseamento de flavonoides totais.

Nível	Réplica	Absorbância	Teor (μ g EQ/mg de extrato)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
50 μ g de equivalentes de Quercetina/mL	1	0,378	49,98	99,95	
	2	0,388	51,15	102,31	101,36
	3	0,386	50,92	101,84	
			DP	1,245	
			DPR (%)	1,228	

Nível	Réplica	Absorbância	Teor (μ g EQ/mg de extrato)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100 μ g de equivalentes de Quercetina/mL	1	0,819	101,86	101,86	
	2	0,821	102,09	102,09	101,35
	3	0,804	100,09	100,09	
			DP	1,093	
			DPR (%)	1,079	

Nível	Réplica	Absorbância	Teor (μ g EQ/mg de extrato)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
250 μ g de equivalentes de Quercetina/mL	1	2,099	252,45	100,98	
	2	2,087	251,04	100,41	100,55
	3	2,084	250,68	100,27	
			DP	0,374	
			DPR (%)	0,371	

Recuperação média para os 3 níveis (%) **101,09 ± 0,463**

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para o doseamento do teor de flavonoides totais nos extratos etanólicos brutos de *Monteverdia obtusifolia* é **exato**, pois apresentou recuperação entre 90 e 110% para os três níveis de concentração testados. Os dados obtidos na exatidão foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, onde foi possível observar que o valor-p calculado ($p=0,299$) $> 0,05$ para o doseamento de flavonoides totais demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas nos diferentes níveis avaliados.

A.2.5 Robustez

Esta característica foi estudada verificando-se 4 parâmetros, de acordo com o descrito no protocolo de validação (item A.1.5).

Os resultados para o parâmetro Robustez encontram-se nas Tabela A.10.

Tabela A.10: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de fluxo da fase móvel.

Parâmetro	Variações	Absorbância	Conc. ($\mu\text{g EQ/mg}$ de extrato)	Média ($\mu\text{g EQ/mg}$ de extrato)	DPR (%)
Tempo de leitura das amostras	20 min	0,799	99,51		
		0,802	99,86	99,86	0,35
		0,805	100,21		
	40 min	0,803	99,98		
		0,811	100,92	100,53	0,49
		0,809	100,68		
Comprimento de onda	410 nm	0,765	95,51		
		0,772	96,33	96,41	0,98
		0,781	97,39		
	440 nm	0,79	98,45		
		0,789	98,33	98,23	0,32
		0,785	97,86		
Concentração da solução de AlCl_3	2 %	0,739	92,45		
		0,747	93,39	92,96	0,51
		0,744	93,04		
	3 %	0,808	100,56		
		0,813	101,15	100,49	0,71
		0,801	99,74		
Solvente	Tedia	0,808	100,56		
		0,814	101,27	100,92	0,35
		0,811	100,92		

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Conclusão: O método proposto para doseamento de flavonoides totais nos extratos secos de *Monteverdia obtusifolia* é **robusto nos parâmetros do método validado**, apresentando recuperação na faixa de 95-105% para quase todos os parâmetros avaliados. Exceto o parâmetro de concentração da solução de AlCl_3 (2%), que apresentou recuperação média de 92,96%,

indicando que a menor concentração de cloreto de alumínio pode interferir no doseamento dos flavonoides totais.

APÊNDICE B

Validação de metodologia analítica para doseamento de Compostos fenólicos totais

B.1 Execução dos testes de validação analítica

B.1.1 Especificidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de três tipos de amostras:

Amostra 1: Controle positivo tipo 1 (Solução Padrão).

Amostra 2: Controle positivo tipo 2 (Amostra – EEB Maio/2017).

Amostra 3: Controle negativo 1 (Solvente)

Amostra 4: Controle negativo 2 (Solução de carbonato de sódio 7,5%)

B.1.1.2 Procedimento

a) Preparo da solução padrão

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 20,00 mg da substância química de referência da Ácido Gálico. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 20,0 mL. Foram adicionados 15,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 20,0 mL (Solução estoque 1 - S1).

Para análise da amostra 1 (controle positivo – solução padrão), foi pipetado 0,3 mL da (S1) e transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução padrão = 300 µg de Ácido
Gálico/mL

b) Preparo da solução amostra

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia* referente ao mês de Maio de 2017. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 8,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1a).

Concentração final da solução amostra = 1 mg/mL do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia*

Para avaliação do parâmetro especificidade, 100 μ L das soluções referentes às amostras 1, 2, 3 e 4 foram tratadas com 500 μ L do reagente Folin-Ciocalteau (diluído 1:10) e 400 μ L de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek, USA) a 765 nm.

B.1.2 Linearidade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de 11 soluções da substância química de referência (Ácido Gálico), com uso de padrão externo, nas seguintes concentrações: 7,5, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 μ g/mL. Estas foram obtidas, por meio de diluições, em triplicata, a partir de uma solução estoque, resultando em 33 soluções padrões para análise.

b) Solução Padrão (Solução mãe)

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 20,00 mg da substância química de referência da Ácido Gálico. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 20,0 mL. Foram adicionados 15,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 20,0 mL (Solução estoque 1 - S1).

Concentração final da solução estoque (S1) = 1000 μ g de
Ácido Gálico/mL

Preparo das soluções:

a) 7,5 μ g/mL: pipetou-se 75 μ L da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 7,5 μ g/mL;

b) 15 µg/mL: pipetou-se 150 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 15 µg/mL;

c) 25 µg/mL: pipetou-se 250 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 25 µg/mL;

d) 50 µg/mL: pipetou-se 500 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 50 µg/mL;

e) 75 µg/mL: pipetou-se 750 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 75 µg/mL;

b) 100 µg/mL: pipetou-se 1000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 100 µg/mL;

c) 150 µg/mL: pipetou-se 1500 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 150 µg/mL;

d) 200 µg/mL: pipetou-se 2000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 200 µg/mL;

e) 300 µg/mL: pipetou-se 3000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 300 µg/mL;

d) 400 µg/mL: pipetou-se 4000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 400 µg/mL;

e) 500 µg/mL: pipetou-se 5000 µL da solução estoque (S1), foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume ajustado com metanol.

Concentração final da solução: 500 µg/mL;

Após o preparo das amostras para análise, 100 µL das soluções (7,5-500 µg/mL) foram tratadas com 500 µL do reagente Folin-Ciocalteau (diluído 1:10) e 400 µL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek, USA) a 765 nm.

B.1.3 Precisão (repetibilidade) e Precisão intermediária

a) Preparo da solução amostra

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 10,00 mg do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia* referente ao mês de Maio de 2017. Em seguida, o material foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados 8,0 mL de metanol e o balão permaneceu no banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, o volume foi ajustado com q.s.p. de metanol para 10,0 mL (Solução estoque 1 - S1a).

Concentração final da solução amostra = 1 mg/mL do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. obtusifolia*

Para avaliação do parâmetro precisão, 100 µL das soluções (7,5-500 µg/mL) foram tratadas com 500 µL do reagente Folin-Ciocalteau (diluído 1:10) e 400 µL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 2 horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PowerWave HT, BioTek, USA) a 765 nm.

B.1.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de 6 determinações a 100% da concentração do teste com o mesmo analista e mesma instrumentação. Para avaliação da precisão foram preparadas 3 soluções mãe conforme item B.1.3.a, e a leitura foi realizada em triplicata. Os resultados foram avaliados considerando a absorbância referente ao ativo Ácido Gálico, e o coeficiente de

variação percentual relativo a seis repetições, com critério de aceitação para o coeficiente de variação $\leq 5\%$.

B.1.3.2 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária foi realizada por um segundo analista, no dia seguinte da repetibilidade, que preparou seis determinações a 100% da concentração do teste, utilizando a mesma instrumentação e método analítico. Os resultados foram avaliados considerando a absorbância referente ao ativo Quercetina e o coeficiente de variação percentual, relativo a seis repetições, com critério de aceitação para o coeficiente de variação $\leq 5\%$.

B.1.4 Exatidão

Para avaliar esse parâmetro foram preparadas 3 amostras, em triplicata, nas concentrações 50, 300 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (total de 9 amostras). Foi utilizada a metodologia por adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de analito (padrão de referência – Ácido Gálico) à solução da amostra (extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*).

A exatidão foi avaliada através da percentagem de recuperação da solução de Ácido Gálico, adicionada às amostras de solução do extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*. O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de uma solução contendo 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ácido Gálico à solução amostra do extrato etanólico bruto de *M. obtusifolia*, conforme descrito abaixo.

A solução padrão foi preparada conforme o item B.1.2.a (A solução amostra foi preparada conforme o item B.1.1.2.b).

B.1.4.1 Exatidão 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 100 μL da solução amostra e 20 μL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução= 50 μg de equivalentes de
Ácido Gálico/ mL

B.1.4.2 Exatidão 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 100 µL da solução amostra e 270 µL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução = 300 µg de equivalentes de
Ácido Gálico/mL

B.1.4.3 Exatidão 500 µg/mL

Para avaliação da exatidão neste ponto, foi tomada alíquota de 100 µL da solução amostra e 470 µL da solução padrão.

Concentração final teórica da solução = 500 µg de equivalentes de
Ácido Gálico/mL

O critério de conformidade será de 90 a 110 % de recuperação.

B.1.5 Robustez

Esse parâmetro foi realizado com 04 variações na metodologia analítica na concentração de 100% da concentração teórica da amostra e padrão, descritas na Tabela B.1.

Tabela B.1 – Descrição dos parâmetros avaliados na robustez da metodologia analítica para doseamento de flavonoides totais.

Parâmetros	Condições do método	Variações	
Tempo de Leitura das Amostras	Após 2 horas	1 hora e 30 min	2 horas e 30 min
Comprimento de onda	765 nm	750 nm	780 nm
Concentração da solução Na ₂ CO ₃	7,5 %	6 %	9 %
Solventes	Metanol Merck® Ref. 1.06007.4000 Lote I722807 402	Metanol J Baker® Ref. MFCD00004595 Lote 2103948	

Fonte: ARAÚJO, 2021.

B.2 Resultados da validação analítica

B.2.1 Especificidade

Tabela B.2 – Resultados obtidos na avaliação do parâmetro especificidade.

Soluções avaliadas	Absorbância	Concentração ($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)	Média	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
Padrão	1,733	299,95	300,68	0,68	0,23
	1,737	300,63			
	1,741	301,31			
Amostra	1,727	298,93	299,67	0,76	0,26
	1,731	299,61			
	1,736	300,46			
Solvente	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00
	0,000	0,000			
	0,000	0,000			
Solução de Carbonato de Sódio (7,5 %)	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00
	0,000	0,000			
	0,000	0,000			

O método proposto para doseamento compostos fenólicos totais no extrato etanólico bruto (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* é específico, pois não apresentou interferência nos testes de especificidade determinados (controles negativos).

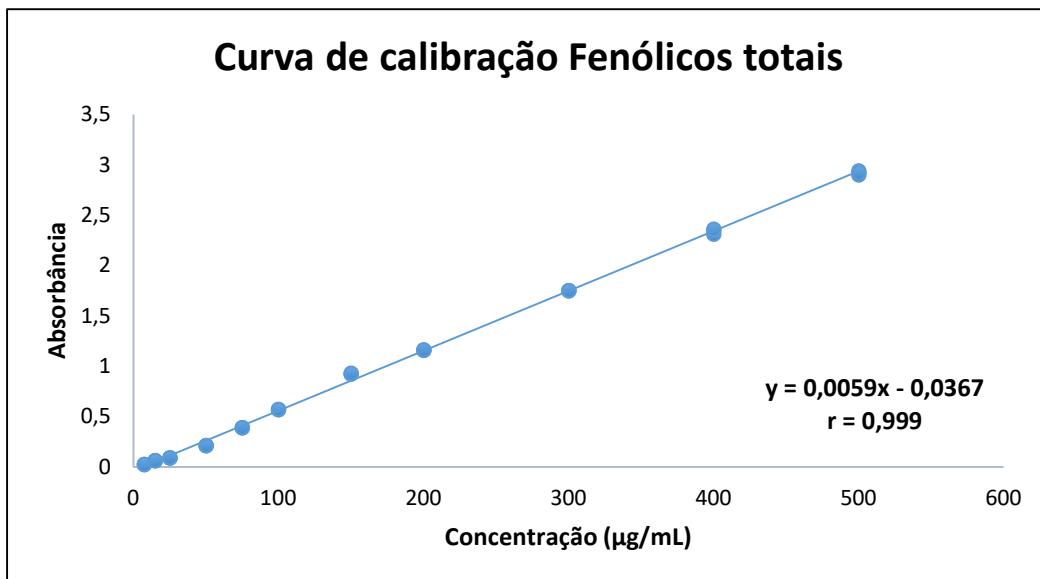
B.2.2 Linearidade

Tabela B.3: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador Ácido Gálico (n=33).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Absorbância	Média	DPR (%)
(7,5 µg/mL)	1	0,024		
	2	0,022	0,023	4,95
	3	0,024		
(15 µg/mL)	1	0,062		
	2	0,059	0,061	2,52
	3	0,061		
(25 µg/mL)	1	0,087		
	2	0,086	0,088	2,37
	3	0,090		
(50 µg/mL)	1	0,208		
	2	0,212	0,210	0,99
	3	0,211		
(75 µg/mL)	1	0,387		
	2	0,390	0,388	0,39
	3	0,388		
(100 µg/mL)	1	0,569		
	2	0,568	0,570	0,37
	3	0,572		
(150 µg/mL)	1	0,920		
	2	0,924	0,925	0,60
	3	0,931		
(200 µg/mL)	1	1,160		
	2	1,157	1,160	0,26
	3	1,163		
(300 µg/mL)	1	1,752		
	2	1,747	1,750	0,15
	3	1,751		
(400 µg/mL)	1	2,310		
	2	2,350	2,340	1,13
	3	2,360		
(500 µg/mL)	1	2,940		
	2	2,900	2,920	0,68
	3	2,920		

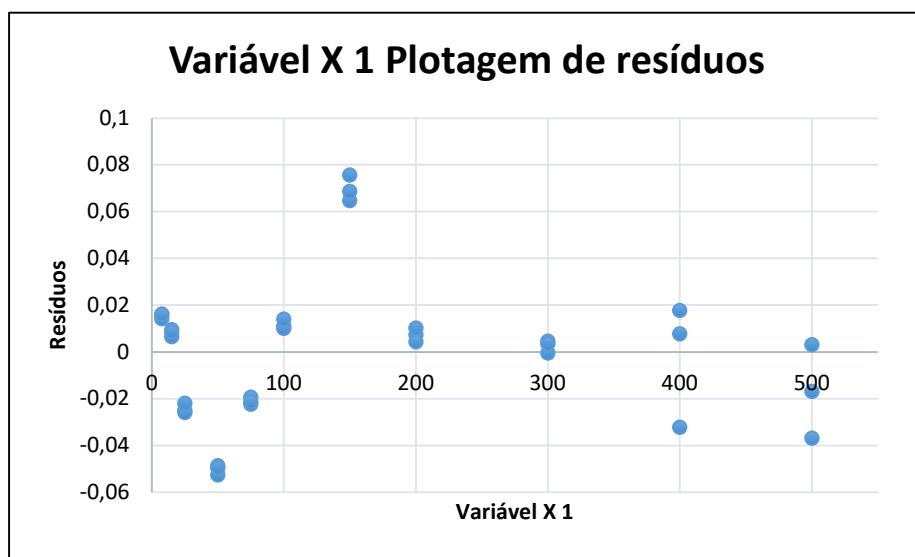
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico B.1: Regressão linear da curva de calibração (7,5 – 500 µg/mL) para o marcador Ácido Gálico.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico B.2: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador Ácido Gálico.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para o doseamento do teor de flavonoides totais nos extratos etanólicos brutos de *Monteverdia obtusifolia* é linear, pois o marcador apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99, estando semelhante ao valor estabelecido pela resolução (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017). Também na

avaliação estatística ANOVA observou-se que $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, indicando que há correlação linear estatística entre os dados, ou seja, a equação linear proposta é adequada para descrever os dados experimentais, uma vez que os valores observados experimentalmente não diferem daqueles previstos pela equação. Os dados detalhados da regressão linear estão apresentados nas Tabelas B4 e B5.

Tabela B.4: Análise estatística de regressão da curva de calibração (7,5 – 500 µg/mL) para o marcador Ácido Gálico.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999495817
R-Quadrado	0,998991888
R-quadrado ajustado	0,998959368
Erro padrão	0,031076266
Observações	33

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	29,66693	29,66693	30719,55	5,1E-48
Resíduo	31	0,029938	0,000966		
Total	32	29,69687			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,036736194	0,007802	-4,70854	4,94E-05	-0,05265	-0,02082	-0,05265	-0,02082
	0,005947379	3,39E-05	175,2699	5,1E-48	0,005878	0,006017	0,005878	0,006017

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela B.4: Resultados dos resíduos da análise de regressão da curva de calibração (7,5 – 500 µg/mL) para o marcador Ácido Gálico.

Observação	Previsto(a) ABS	Resíduos	Resíduos padrão
1	0,007869149	0,016131	0,527379
2	0,007869149	0,014131	0,461991
3	0,007869149	0,016131	0,527379
4	0,052474491	0,009526	0,311425
5	0,052474491	0,006526	0,213344
6	0,052474491	0,008526	0,278731
7	0,11194828	-0,02495	-0,81565
8	0,11194828	-0,02595	-0,84835
9	0,11194828	-0,02195	-0,71757
10	0,260632754	-0,05263	-1,72076
11	0,260632754	-0,04863	-1,58999
12	0,260632754	-0,04963	-1,62268
13	0,409317227	-0,02232	-0,72963
14	0,409317227	-0,01932	-0,63155
15	0,409317227	-0,02132	-0,69694
16	0,558001701	0,010998	0,359576
17	0,558001701	0,009998	0,326882
18	0,558001701	0,013998	0,457657
19	0,855370648	0,064629	2,112979
20	0,855370648	0,068629	2,243754
21	0,855370648	0,075629	2,47261
22	1,152739596	0,00726	0,23737
23	1,152739596	0,00426	0,139289
24	1,152739596	0,01026	0,335452
25	1,74747749	0,004523	0,147858
26	1,74747749	-0,00048	-0,01561
27	1,74747749	0,003523	0,115164
28	2,342215385	-0,03222	-1,05324
29	2,342215385	0,007785	0,254509
30	2,342215385	0,017785	0,581447
31	2,93695328	0,003047	0,099609
32	2,93695328	-0,03695	-1,20814
33	2,93695328	-0,01695	-0,55427

Fonte: ARAÚJO, 2021.

B.2.3 Precisão

Tabela B.6: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrida para o doseamento de compostos fenólicos totais realizado pelo Analista 1.

Repetição	Concentrações	
	Absorbância	($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)
Analista 1	1	1,729
	2	1,734
	3	1,738
	4	1,733
	5	1,74
	6	1,737
Média		300,57
DP		0,60
DPR (%)		0,20

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela B.7: Dados obtidos no parâmetro Precisão intra-corrida para o doseamento de compostos fenólicos totais realizado pelo Analista 2.

Repetição	Concentrações	
	Absorbância	($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)
Analista 2	1	1,722
	2	1,733
	3	1,735
	4	1,741
	5	1,744
	6	1,739
Média		301,36
DP		0,43
DPR (%)		0,14

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela B.8: Dados obtidos no parâmetro Precisão intercorrida para o doseamento de compostos fenólicos totais realizado pelos Analistas 1 e 2.

Repetição	Áreas	Concentrações	
		(μ g EAG/mg de extrato)	
Analista 1	1	1,729	299,27
	2	1,734	300,12
	3	1,738	300,80
	4	1,733	299,95
	5	1,74	301,14
	6	1,737	300,63
Analista 2	1	1,722	298,08
	2	1,733	299,95
	3	1,735	300,29
	4	1,741	301,31
	5	1,744	301,81
	6	1,739	300,97
		Média	300,36
		DP	1,00
		DPR (%)	0,33

O método proposto para o doseamento do teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos brutos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* é **preciso**, pois apresenta desvios padrões inferiores a 5%, tanto para a precisão intra-corridas quanto para precisão intercorridas (BRASIL, 2003). Os dados obtidos na precisão foram submetidos ao teste t de Student, onde foi possível observar que o $t_{calculado}$ ($t=0,891$) < $t_{crítico}$ (2,228) para o doseamento de compostos fenólicos totais demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas entre os dois dias.

B.2.4 Exatidão

Tabela B.9: Dados do parâmetro Exatidão para o doseamento de compostos fenólicos totais.

Nível	Réplica	Absorbância	Teor ($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
50 μg de equivalentes de Ácido Gálico/mL	1	0,269	51,81	103,63	
	2	0,263	50,80	101,59	102,50
	3	0,265	51,14	102,27	
			DP	1,036	
			DPR (%)	1,010	

Nível	Réplica	Absorbância	Teor ($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
300 μg de equivalentes de Ácido Gálico/mL	1	1,732	299,78	99,93	
	2	1,741	301,31	100,44	100,28
	3	1,742	301,47	100,49	
			DP	0,311	
			DPR (%)	0,310	

Nível	Réplica	Absorbância	Teor ($\mu\text{g EAG/mg de extrato}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
500 μg de equivalentes de Ácido Gálico/mL	1	2,917	500,63	100,13	
	2	2,925	501,98	100,40	100,28
	3	2,923	501,64	100,33	
			DP	0,141	
			DPR (%)	0,141	

Recuperação média para os 3 níveis (%) **101,02 ± 1,232**

Fonte: ARAÚJO, 2021.

O método proposto para o doseamento do teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos brutos (EEB) de *Monteverdia obtusifolia* é **exato**, pois apresentou recuperação entre 90 e 110% para os três níveis de concentração testados. Os dados obtidos na exatidão foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, onde foi possível observar que o valor-p calculado ($p=0,233$) $> 0,05$ para o doseamento de compostos fenólicos totais demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações obtidas nos diferentes níveis avaliados.

B.2.5 Robustez

Esta característica foi estudada verificando-se 4 parâmetros, de acordo com o descrito no protocolo de validação (item A.1.5).

Os resultados para o parâmetro Robustez encontram-se nas Tabela B.10.

Tabela B.10: Dados obtidos para a robustez no parâmetro alteração de fluxo da fase móvel.

Parâmetro	Variações	Absorbância	Conc. ($\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato)	Média ($\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato)	Recup. média (%)	DPR (%)
Tempo de leitura das amostras	1 hora e 30 min	1,698	294,02			
		1,689	292,49	293,68	97,89	0,36
		1,701	294,53			
	2 horas e 30 min	1,722	298,08			
		1,725	298,59	298,14	99,38	0,14
		1,72	297,75			
Comprimento de onda	750 nm	1,679	290,80			
		1,688	292,32	291,64	97,21	0,27
		1,685	291,81			
	780 nm	1,699	294,19			
		1,709	295,88	295,20	98,40	0,30
		1,707	295,54			
Concentração da solução de Na_2CO_3	6 %	1,644	284,86			
		1,651	286,05	285,71	95,24	0,26
		1,652	286,22			
	9 %	1,782	308,25			
		1,775	307,07	307,46	102,49	0,22
		1,775	307,07			
Solvente	J.T.Baker	1,733	299,95			
		1,745	301,98	301,47	100,49	0,45
		1,748	302,49			

O método proposto para doseamento de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos brutos de *Monteverdia obtusifolia* é **robusto nos parâmetros do método validado**, apresentando recuperação na faixa de 95-105% para todos os parâmetros avaliados. Entretanto a menor concentração da solução de carbonato de sódio (6%), que apresentou recuperação média de

95,24%, requer cautela em seu uso visto que pode vir a interferir no doseamento dos compostos fenólicos totais, dessa forma, recomenda-se o uso da concentração utilizada no processo de validação (Na_2CO_3 7,5%).

APÊNDICE C

Curva de calibração para quantificação dos marcadores em *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral

C.1.1 Curva de calibração para quantificação dos marcadores em *M. rigida*

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de preparações dos marcadores nas seguintes concentrações para os marcadores (-)-Epigalocatequina (1 – 25 µg/mL); (+)-Catequina (1 – 10 µg/mL); (-)-Epicatequina (1 – 10 µg/mL). Estas foram obtidas, por meio de diluições utilizando padrão externo, em triplicata, resultando em 15 soluções padrões para análise.

a) Solução estoque de (-)-Epigalocatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0000 mg da substância química de referência (-)-Epigalocatequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 100 µg de (-)-Epigalocatequina/mL

Preparo das soluções:

z) 1 µg/mL: pipetou-se 0,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 1 µg/mL

aa) 5 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 5 µg/mL

bb) 10 µg/mL: pipetou-se 1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 10 µg/mL;

cc) 15 µg/mL: pipetou-se 1,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 15 µg/mL;

dd) 25 µg/mL: pipetou-se 2,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 25 µg/mL;

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

b. Solução estoque de (+)-Catequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0000 mg da substância química de referência (+)-Catequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 100 µg de (+)-Catequina/mL

Preparo das soluções:

ee) 1 µg/mL: pipetou-se 0,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 1 µg/mL

ff) 2,5 µg/mL: pipetou-se 0,25 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 2,5 µg/mL

gg) 5 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 5 µg/mL;

hh) 7,5 µg/mL: pipetou-se 0,75 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 7,5 µg/mL;

ii) 10 µg/mL: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 10 µg/mL;

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

c. Solução estoque de (-)-Epicatequina

Pesou-se em balança analítica, exatamente, 1,0000 mg da substância química de referência (-)-Epicatequina que, em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL completando o volume com q.s.p. de metanol.

Concentração final da solução = 100 µg de (-)-Epicatequina/mL

Preparo das soluções:

jj) 1 µg/mL: pipetou-se 0,1 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 1 µg/mL

kk) 2,5 µg/mL: pipetou-se 0,25 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 2,5 µg/mL

ll) 5 µg/mL: pipetou-se 0,5 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 5 µg/mL;

mm) 7,5 µg/mL: pipetou-se 0,75 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 7,5 µg/mL;

nn) 10 µg/mL: pipetou-se 1,0 mL da solução padrão estoque e a alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com metanol.

Concentração final da solução: 10 µg/mL;

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

C. 1.2 Efeito matriz

Para a avaliação do parâmetro de efeito de matriz, foi utilizada a técnica de adição de padrão externo. Foram preparadas soluções estoque dos respectivos marcadores químicos (-)-Epigallocatequina (conforme item C.1.1.a), (+)-Catequina (conforme item C.1.1.b) e (-)-Epicatequina (conforme item C.1.1.c) e em seguida, as concentrações do intervalo de trabalho de cada marcador foram obtidas pela adição à solução amostra do extrato etanólico das folhas de *Monteverdia rigida* (volume fixo de 1000 µL). O volume final foi completado com metanol. De modo que as concentrações finais de análise corresponderam às utilizadas na avaliação da linearidade.

O efeito matriz pode ser mensurado por meio da Equação:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left[\frac{\text{Coeficiente angular curva matriz}}{\text{Coeficiente angular curva solvente}} - 1 \right] \times 100$$

O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (BRASIL, 2017). Foram avaliados o percentual de efeito matriz de cada marcador de acordo com a equação acima, bem como foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras não-matrizadas e matrizadas podem ser

consideradas estatisticamente iguais, seguido de *t* de Student: comparação das médias.

C.1.2.1 Efeito matriz para (-)-Epigallocatequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epigallocatequina (100 µg/mL) à solução amostra do extrato etanólico das folhas de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral (1 mg/mL).

Tabela C.1: Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epigallocatequina.

Concentração (µg/mL)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (µL)	Solução Amostra (µL)	Volume final (µL)
1	100 µg/mL	10	200	5000
5	100 µg/mL	210	200	5000
10	100 µg/mL	460	200	5000
15	100 µg/mL	710	200	5000
25	100 µg/mL	1210	200	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

C.1.2.2 Efeito matriz para (+)-Catequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (+)-Catequina (100 µg/mL) à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral (1 mg/mL).

Tabela C.2: Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (+)-Catequina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (μL)	Solução Amostra (μL)	Volume final (μL)
1	100 $\mu\text{g/mL}$	17	500	5000
2,5	100 $\mu\text{g/mL}$	92	500	5000
5	100 $\mu\text{g/mL}$	217	500	5000
7,5	100 $\mu\text{g/mL}$	342	500	5000
10	100 $\mu\text{g/mL}$	467	500	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 μm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

C.1.2.3 Efeito matriz para (-)-Epicatequina

O ensaio foi realizado, em triplicata, com base na faixa de linearidade do método, através da adição de quantidades crescentes de soluções contendo (-)-Epicatequina (100 $\mu\text{g/mL}$) à solução amostra do extrato etanólico de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral (1 mg/mL).

Tabela C.3: Preparo da curva analítica para o efeito de matriz do marcador (-)-Epicatequina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução utilizada (padrão)	Aliquota (μL)	Solução Amostra (μL)	Volume final (μL)
1	100 $\mu\text{g/mL}$	17	500	5000
2,5	100 $\mu\text{g/mL}$	92	500	5000
5	100 $\mu\text{g/mL}$	217	500	5000
7,5	100 $\mu\text{g/mL}$	342	500	5000
10	100 $\mu\text{g/mL}$	467	500	5000

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Após o preparo, as amostras foram filtradas para os vials usando filtro millex HN (nylon) 0,45 µm x 13mm. As corridas cromatográficas foram realizadas nas condições do método descritas no item 3.6.

C.1.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

De acordo com os guias para validação de metodologias analíticas disponíveis na literatura, é possível realizar a determinação dos valores de LD e LQ por extração matemática da curva de calibração ao analisar os padrões dos marcadores em concentrações decrescentes (FDA, 2015; EMA, 2016; BRASIL, 2017; MARSON *et al.*, 2020) Os valores podem ser obtidos de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Limite de detecção: } \frac{3 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

Para o cálculo do limite de quantificação foi utilizada a equação:

$$\text{Limite de quantificação: } \frac{10 \times s}{a}$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão. E “a” é a inclinação da reta obtida para o marcador.

Foram quantificados os limites de detecção e quantificação para os marcadores (-)-epigalocatequina, (+)-catequina e (-)-epicatequina utilizando os dados obtidos na linearidade com solvente e na linearidade para verificação do efeito matriz.

C.2 Resultados

C.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção de curvas de calibração, por padronização externa, utilizando as substâncias químicas de referência dos marcadores (-)-Epigalocatequina (1 µg/mL a 25 µg/mL), (+)-Catequina (1 µg/mL a 10 µg/mL) e (-)-Epicatequina (1 µg/mL a 10 µg/mL).

O método dos mínimos quadrados é utilizado para estabelecer a curva de calibração. As amostras analisadas foram padrões contendo somente o composto examinado de acordo com o estabelecido na parte experimental deste estudo. A curva de calibração foi preparada com os resultados de diferentes concentrações e a média de 3 repetições por nível de concentração. A análise de variância da regressão levou à determinação da existência de um coeficiente angular significativo e à validade da reta de regressão.

A Tabela C.4 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epigalocatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 2806,1x - 1430,7$). O valor de F ($96226 > F$ significação ($1,53 \times 10^{-26}$)) e valor- P ($1,53 \times 10^{-26} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos C.1 e C.2.

A Tabela C.5 apresenta os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (+)-Catequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 7401x + 757,07$). O valor de F ($70221,4 > F$ significação ($1,2 \times 10^{-25}$)) e valor- P ($1,2 \times 10^{-25} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos C.3 e C.4.

A Tabela C.6 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva padrão do marcador (-)-Epicatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 1 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 17866x - 10646$). O valor de F ($907120 > F$ significação ($7,12 \times 10^{-33}$)) e valor- P ($7,12 \times 10^{-33} < 0,05$). A curva de calibração e o gráfico de resíduos são apresentados nos Gráficos C.5 e C.6.

Estes resultados estão de acordo com a recomendação da ANVISA para validação de metodologias analíticas (RE nº 899/2003 e RDC 166/2017), na qual o valor mínimo do coeficiente de correlação deve ser 0,99 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

A tabela C.7 resume as equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

Os cálculos dos resíduos de cada marcador confirmaram a validade do modelo de calibração adotado, observando-se distribuição aleatória de resíduos próximos à média zero, homocedasticidade e ausência de amostras atípicas conforme Figuras C.1 e C.2. O método proposto para o doseamento de (-)-Epigallocatequina, (+)-Catequina e (-)-Epicatequina no extrato etanólico de *Monteverdia rigida* (Mart.) Biral é linear, pois todos os marcadores apresentaram curvas-padrão com coeficiente de correlação superior a 0,99, confirmados pela análise dos resíduos, estando em acordo com a especificação estabelecida na resolução RDC Nº 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

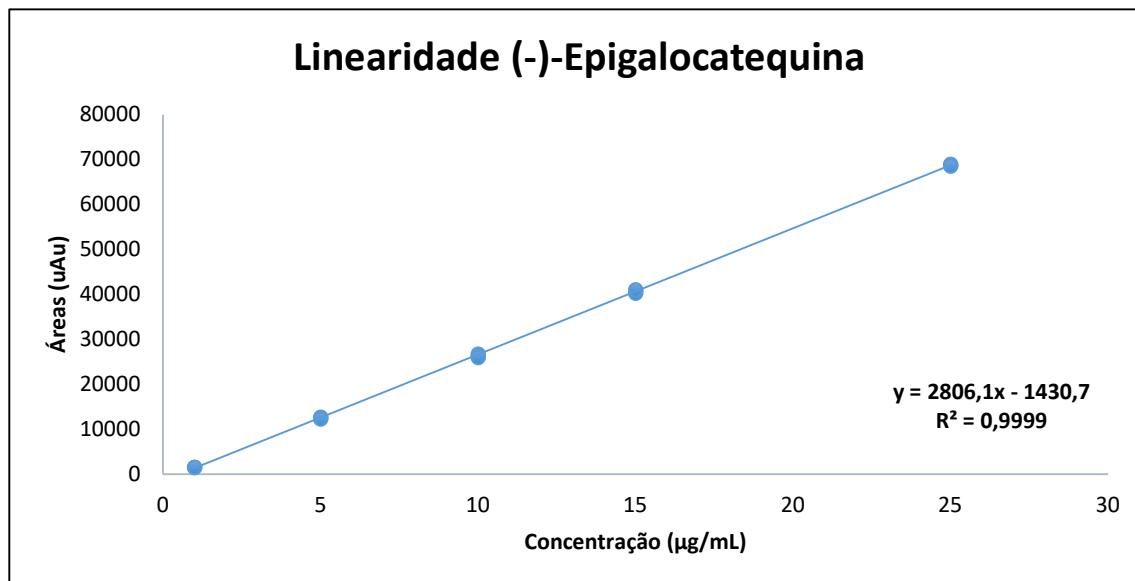
A avaliação estatística ANOVA *one way* observou-se que $F_{\text{calc}} > F$ significação para todos os marcadores avaliados, indicando que há correlação linear estatística entre os dados, ou seja, a equação linear proposta é adequada para descrever os dados experimentais, uma vez que os valores observados experimentalmente não diferem daqueles previstos pela equação.

Tabela C.4: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epigallocatequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 µg/mL	1	1549	1550,333	1,06 µg/mL	1,68
	2	1525			
	3	1577			
5 µg/mL	1	12752	12542	4,98 µg/mL	1,67
	2	12541			
	3	12333			
10 µg/mL	1	26757	26385,33	9,91 µg/mL	1,44
	2	26401			
	3	25998			
15 µg/mL	1	40761	40722,67	15,02 µg/mL	0,99
	2	40302			
	3	41105			
25 µg/mL	1	68770	68786	25,03 µg/mL	0,33
	2	69023			
	3	68565			

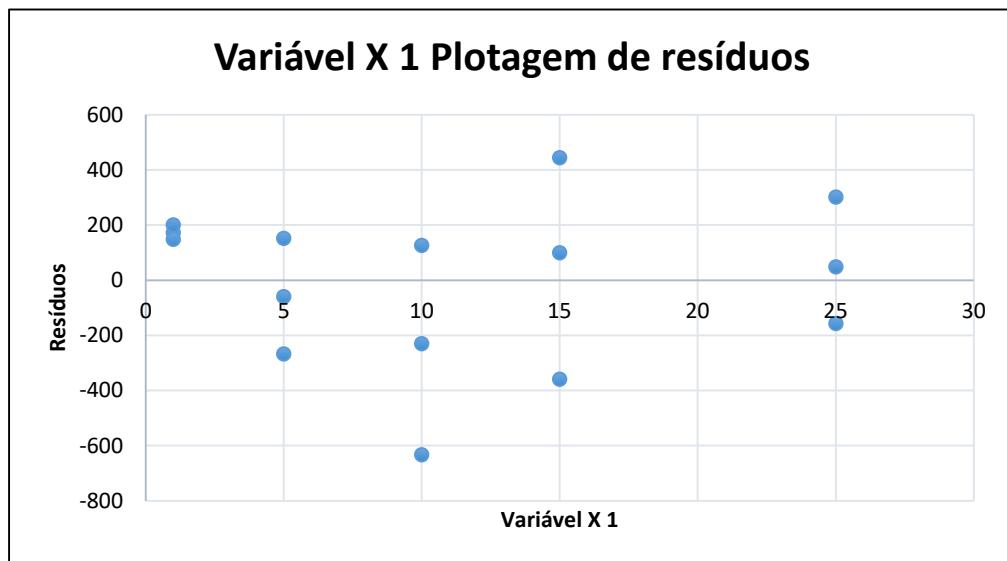
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.1: Regressão linear da curva de calibração (1 – 25 µg/mL) para o marcador (-)-Epigallocatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.2: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epigallocatequina.



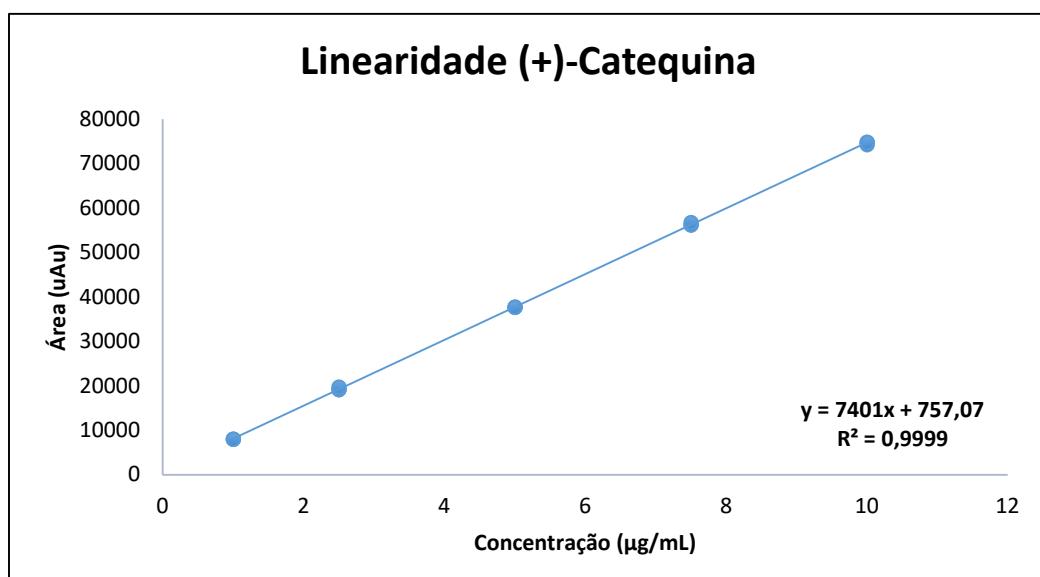
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela C.5: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (+)-Catequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 µg/mL	1	8045			
	2	8012	8029,667	0,98 µg/mL	0,20
	3	8032			
2,5 µg/mL	1	19194			
	2	19211	19392,33	2,52 µg/mL	1,70
	3	19772			
5 µg/mL	1	37740			
	2	37689	37713,33	4,99 µg/mL	0,06
	3	37711			
7,5 µg/mL	1	56305			
	2	56172	56426	7,52 µg/mL	0,59
	3	56801			
10 µg/mL	1	74871			
	2	74307	74650	9,98 µg/mL	0,40
	3	74772			

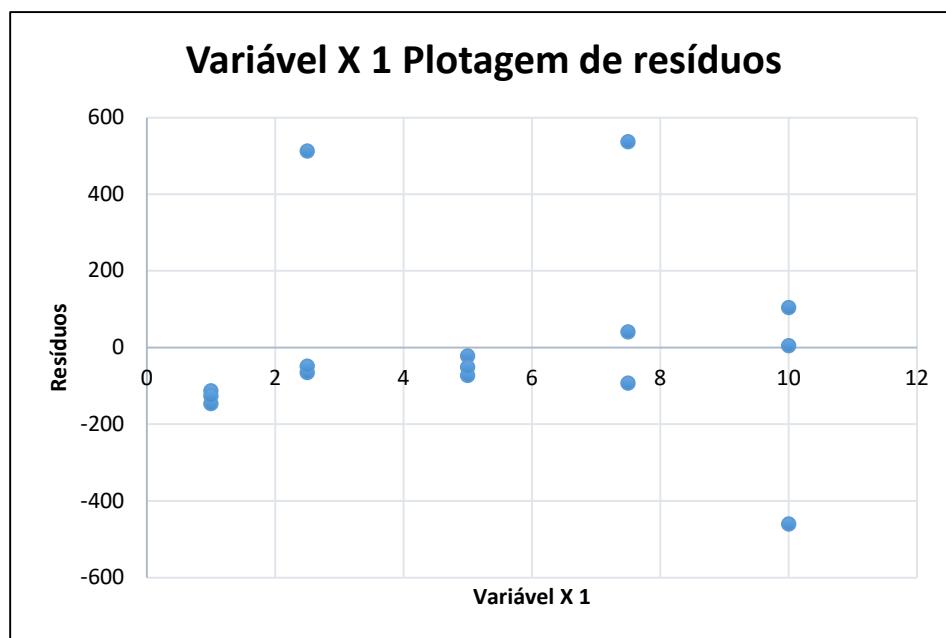
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.3: Regressão linear da curva de calibração (1 – 10 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.4: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (+)-Catequina.



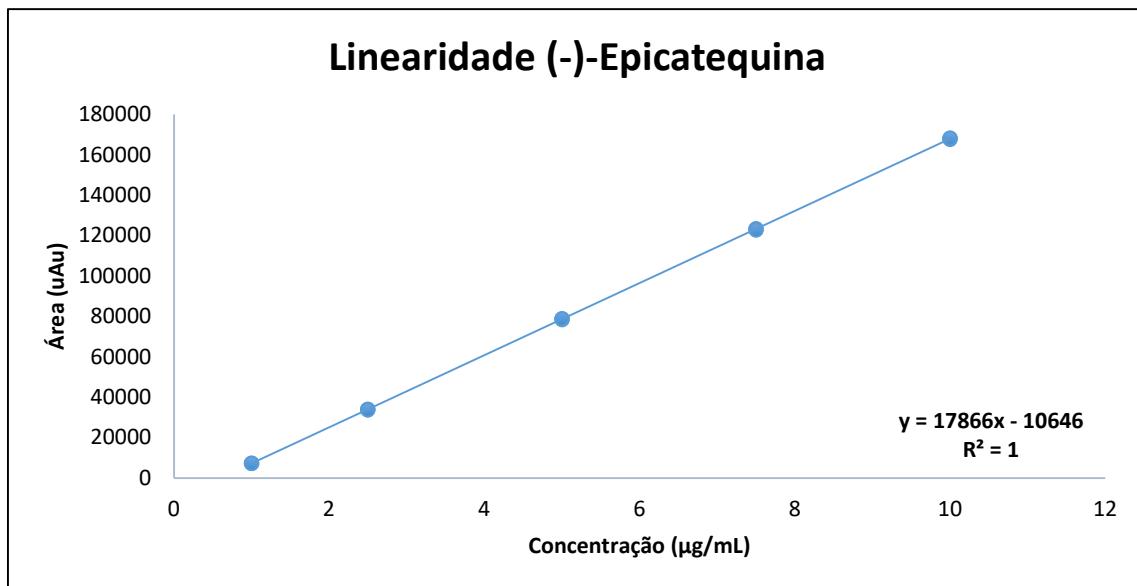
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela C.6: Dados obtidos no parâmetro linearidade para o marcador (-)-Epicatequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 µg/mL	1	7286	7309,667	1,01 µg/mL	0,28
	2	7319			
	3	7324			
2,5 µg/mL	1	34101	33921	2,49 µg/mL	0,50
	2	33895			
	3	33767			
5 µg/mL	1	78794	78754	5,01 µg/mL	0,21
	2	78566			
	3	78902			
7,5 µg/mL	1	123487	123165,3	7,48 µg/mL	0,24
	2	123111			
	3	122898			
10 µg/mL	1	168179	168123,3	10,02 µg/mL	0,20
	2	167758			
	3	168433			

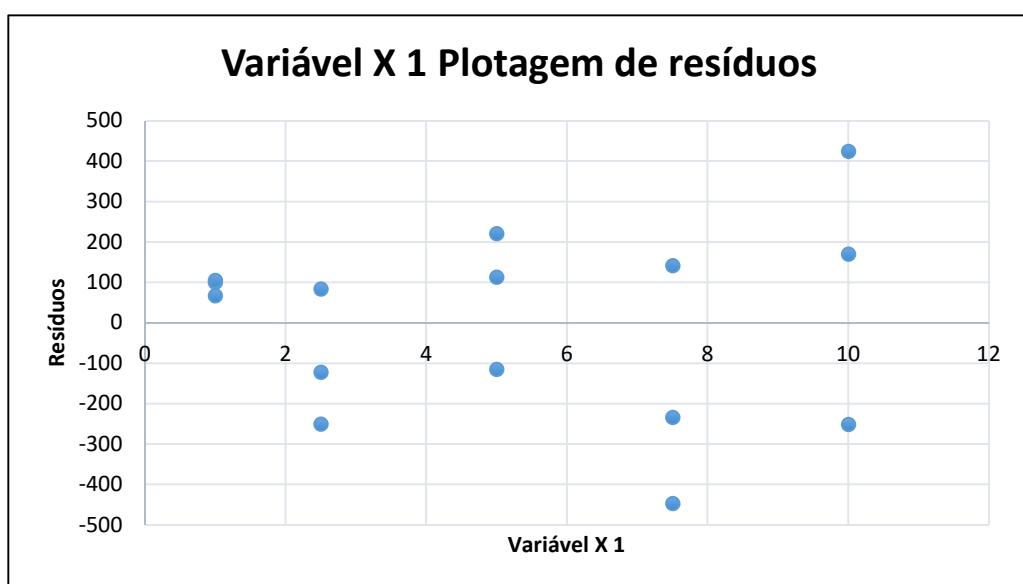
Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.5: Regressão linear da curva de calibração (1 – 10 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.6: Gráfico dos resíduos dos dados de linearidade do marcador (-)-Epicatequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela C.7: Equações das retas obtidas para cada marcador nas repetições do parâmetro linearidade.

Marcador	Repetição	Equação da reta
(-)-Epigalocatequina	1	$y = 2800,9x - 1252,1$
	2	$y = 2811,6x - 1531,2$
	3	$y = 2805,8x - 1508,9$
	Média	$y = 2806,1x - 1430,7$
(+)-Catequina	1	$y = 7424,4x + 624,02$
	2	$y = 7369,8x + 755,15$
	3	$y = 7408,8x + 892,05$
	Média	$y = 7426,2x + 608,9$
(-)-Epicatequina	1	$y = 17877x - 10591$
	2	$y = 17888x - 10753$
	3	$y = 17832x - 10595$
	Média	$y = 17866x - 10646$

Fonte: ARAÚJO, 2021.

C.2.2. Efeito matriz

Os percentuais de interferência do efeito matriz para cada marcador estão dispostos na Tabela C.8.

Tabela C.8: Cálculo de interferência de efeito matriz (% EM) para os marcadores.

Marcador	Coeficiente angular com matriz	Coeficiente angular sem matriz	Interferência
(-)-Epigalocatequina	2851,6	2806,1	1,621 %
(+)-Catequina	7321,7	7401	-1,071 %
(-)-Epicatequina	17758	17866	-0,605 %

Fonte: ARAÚJO, 2021.

A Tabela C.9 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (-)-Epigalocatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9998 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 2851,6x - 426,92$). A curva de calibração está plotada no gráfico C.7. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,033) < $F_{\text{crítico}}$ (2,978). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,952) para o teste de paralelismo, foi possível observar que valor-P > 0,05, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t apresentou valor t (0,302) < t_{tabelado} (2,776) e valor-P (0,777) > 0,05, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

A Tabela C.10 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (+)-Catequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 7321,7x - 836,73$). A curva de calibração está plotada no gráfico C.8. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,022) < $F_{\text{crítico}}$ (2,978). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,969) para o teste de paralelismo, foi possível observar que valor-P > 0,05, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t apresentou valor t (0,002) < t_{tabelado} (2,776) e valor-P (0,999) > 0,05, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

A Tabela C.11 exibe os resultados das injeções para obtenção da curva de calibração para avaliação do efeito matriz do marcador (-)-Epicatequina, que apresentou coeficiente de correlação (r) = 0,9999 ($n=15$) e forneceu a equação da reta ($y = 17758x - 11572$). A curva de calibração está plotada no gráfico C.9. Ao avaliar o teste F, foi possível observar o valor de F (1,012) < $F_{\text{crítico}}$ (2,978). Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então: Aceita-se a hipótese H_0 em que as variâncias das curvas são estatisticamente iguais, a 5% de significância, pelo teste F. Ao avaliar o valor-P obtido (0,982) para o teste de paralelismo, foi possível

observar que valor-P > 0,05, dessa forma não rejeitamos a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Neste caso, afirmamos que as retas são paralelas e significativamente iguais. O teste t apresentou valor t (0,018) < $t_{tabelado}$ (2,776) e valor-P (0,986) > 0,05, demonstrando que não há efeito matriz para as concentrações trabalhadas.

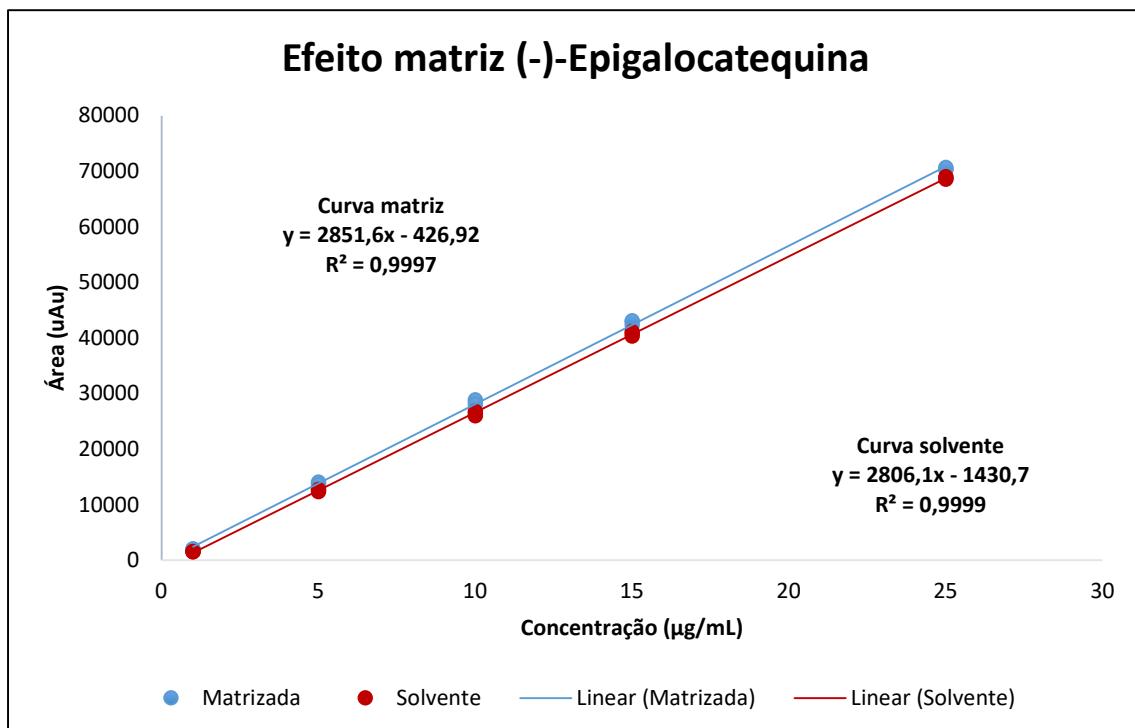
Ao analisar as curvas visualmente, é possível verificar que não houve efeito matriz, uma vez que as construídas com solvente possuem inclinação semelhante às curvas com adição de padrão na matriz (extrato de *M. rigida*). A Tabela C.12 resume os dados de análise estatística para o efeito matriz dos marcadores analisados.

Tabela C.9: Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epigalocatequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	1	1984	2010,667	0,96 $\mu\text{g/mL}$	1,14
	2	2015			
	3	2033			
5 $\mu\text{g/mL}$	1	13902	13840,33	5,00 $\mu\text{g/mL}$	0,55
	2	14041			
	3	13578			
10 $\mu\text{g/mL}$	1	28433	28427	10,12 $\mu\text{g/mL}$	0,91
	2	28842			
	3	28006			
15 $\mu\text{g/mL}$	1	42345	42815,33	15,16 $\mu\text{g/mL}$	0,18
	2	42986			
	3	43115			
25 $\mu\text{g/mL}$	1	70222	70461,67	24,86 $\mu\text{g/mL}$	0,21
	2	70497			
	3	70666			

Fonte: ARAÚJO, 2021

Gráfico C.7: Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (9 – 90 µg/mL) para o marcador (-)-Epigallocatequina.



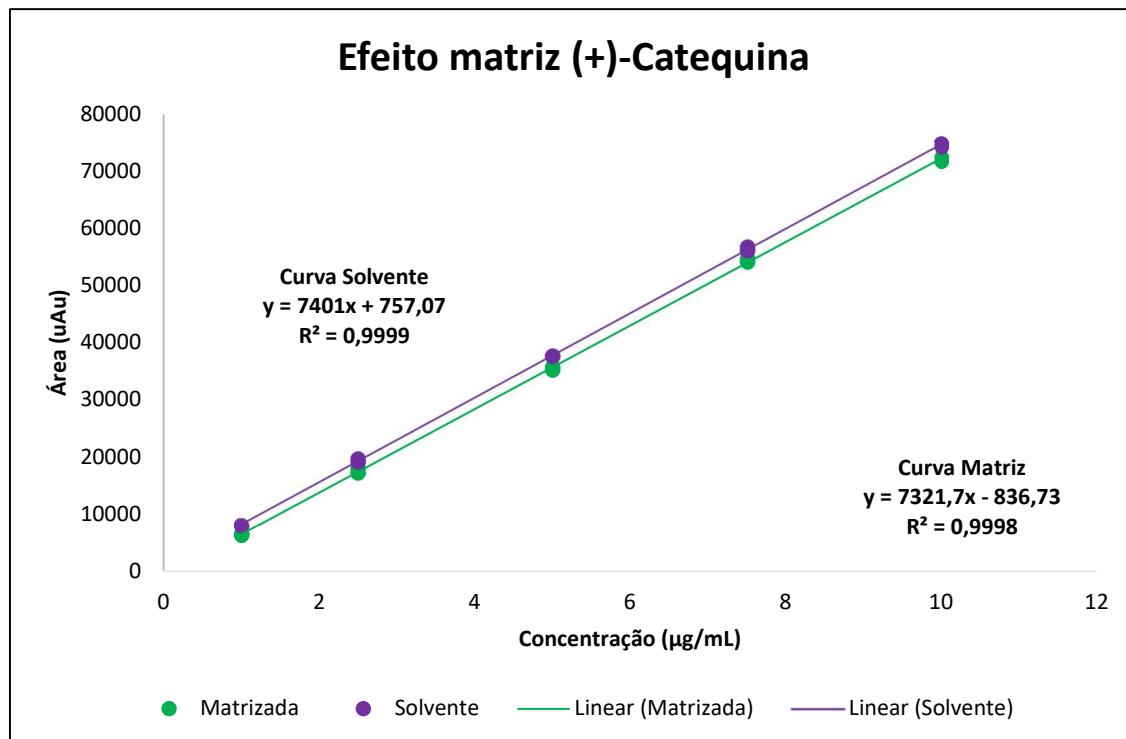
Fonte: ARAÚJO, 2021

Tabela C.10: Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (+)-Catequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 µg/mL	1	6274	6434	0,99 µg/mL	2,47
	2	6592			
	3	6436			
2,5 µg/mL	1	17281	17537,33	2,51 µg/mL	2,27
	2	17997			
	3	17334			
5 µg/mL	1	35290	35581,67	4,97 µg/mL	0,77
	2	35621			
	3	35834			
7,5 µg/mL	1	54181	54429,67	7,55 µg/mL	0,60
	2	54802			
	3	54306			
10 µg/mL	1	72274	72197,33	9,98 µg/mL	0,49
	2	72503			
	3	71815			

Fonte: ARAÚJO, 2021

Gráfico C.8: Regressão linear da curva de calibração (1 – 10 µg/mL) para o marcador (+)-Catequina.



Fonte: ARAÚJO, 2021.

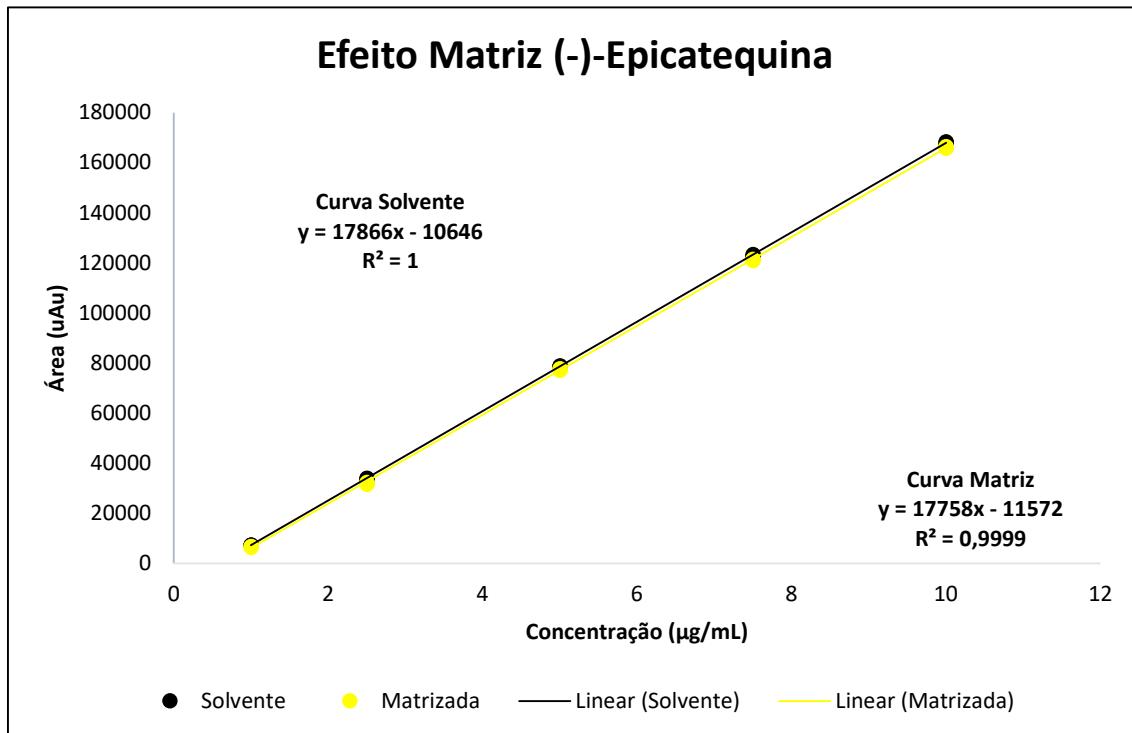
Tabela C.11: Dados obtidos no parâmetro efeito matriz para o marcador (-)-Epicatequina (n=15).

Nível/Concentração teórica	Repetição	Área	Média	Concentração experimental média	DPR (%)
1 µg/mL	1	6743	6688,667	1,03 µg/mL	3,41
	2	6438			
	3	6885			
2,5 µg/mL	1	32457	32090	2,46 µg/mL	1,22
	2	31679			
	3	32134			
5 µg/mL	1	77678	77574,33	5,02 µg/mL	0,42
	2	77210			
	3	77835			
7,5 µg/mL	1	121583	121296	7,48 µg/mL	0,24
	2	120994			
	3	121311			
10 µg/mL	1	166212	166203,7	10,01 µg/mL	0,19

2	166509
3	165890

Fonte: ARAÚJO, 2021.

Gráfico C.9: Regressão linear da curva de calibração criada para o efeito matriz (1 – 10 µg/mL) para o marcador (-)-Epicatequina



Fonte: ARAÚJO, 2021.

Tabela C.12: Resumo da análise estatística do parâmetro efeito matriz para os marcadores analisados.

Marcador	F	valor-P (F)	t	valor-P (t)
(-)-Epigalocatequina	1,033	0,952	0,302	0,777
(+)-Catequina	1,022	0,969	0,002	0,999
(-)-Epicatequina	1,012	0,982	0,018	0,986

Fonte: ARAÚJO, 2021.

C.2.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por extrapolação matemática da curva de calibração de acordo com o guia de validação de