



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JOCIMAR DA SILVA SANTOS**

**MODELO ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO DE DROGA VEGETAL DE  
FOLHAS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER EM DIFERENTES  
GRANULOMETRIAS**

**CAMPINA GRANDE  
2019.**

**JOCIMAR DA SILVA SANTOS**

**MODELO ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO DE DROGA VEGETAL DE  
FOLHAS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER EM DIFERENTES  
GRANULOMETRIAS**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros

**CAMPINA GRANDE  
2019.**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237m Santos, Jocimar da Silva.  
Modelo analítico para caracterização de droga vegetal de folhas da *Schinopsis brasiliensis* Engler em diferentes granulometrias [manuscrito] / Jocimar da Silva Santos. - 2019.  
80 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.  
"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."  
1. Chá. 2. Droga vegetal. 3. Medicamentos fitoterápicos. 4. Quimiometria. I. Título

21. ed. CDD 615.321

**JOCIMAR DA SILVA SANTOS**

**MODELO ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO DE DROGA VEGETAL DE  
FOLHAS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER EM DIFERENTES  
GRANULOMETRIAS**

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

Aprovado em: 12/02/2019

Ana Cláudia D. Medeiros

**Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros**  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB  
Orientadora

José Germano Vêras Neto

**Prof. Dr. José Germano Vêras Neto**  
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB  
Avaliador Interno

Marília de Assis A. Costa

**Profa. Dra. Marília de Assis Alcoforado Costa**  
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB  
Avaliadora Externa

## RESUMO

O uso de produtos naturais e medicamentos fitoterápicos é um dos fatores que tem impulsionado a comprovação e correlação entre conhecimento popular e dados científicos. Nesta perspectiva, a *Schinopsis brasiliensis* E. é uma árvore bastante utilizada na medicina tradicional para diversas patologias, como inflamação, infecção, candidíase, etc. As folhas desta espécie são utilizadas como matéria prima para produção de chás, no entanto necessita-se de padronização da droga vegetal como forma de garantir qualidade, segurança e eficácia, além de possibilitar a utilização desta espécie como candidata ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar por métodos analíticos, físico-químicos, quimiométricos e biológicos a droga vegetal produzida pelas folhas da *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos. Para isto, as folhas foram coletadas na região semiárida da Paraíba, foram secas, pulverizadas e separadas por granulometria dos pós. Foi utilizado o planejamento experimental composto central que avaliou o perfil antimicrobiano através do método de microdiluição em caldo, para avaliação da concentração inibitória mínima. No planejamento o tamanho granulométrico e a concentração da infusão foram as variáveis independentes, as quais foram analisadas utilizando o espectro de infravermelho próximo. Após as análises, foram aplicadas as seguintes técnicas quimiométricas: análise por agrupamentos hierárquicos (HCA), componentes principais (PCA) e modelagem flexível e independente por analogia de classe (SIMCA). Foi utilizado a microscopia óptica para avaliação da morfologia e uniformização das partículas, além da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de ultravioleta para quantificação de metabólitos secundários e avaliação qualitativa de marcador químico. Também foram aplicados métodos termoanalíticos para caracterizar a droga vegetal através de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA). Como resultado, as folhas apresentaram potencial efeito antifúngico frente a cepas de *Candida* spp., sendo observado que a diminuição e a uniformização do tamanho de partícula favorece esta ação. O resultado é corroborado com os dados quimiométricos que conseguem separar as partículas em pequenas, médias e grandes. Os dados morfológicos apresentaram as partículas com tamanhos uniformes, além de superfícies irregulares. Em relação a composição química foi possível quantificar o teor de flavonóides, taninos e em maior quantidade, os polifenóis, além de identificar o ácido gálico por CLAE. Os dados termoanalíticos também mostram que o comportamento térmico das partículas apresentam características uniformes e variações de acordo com o tamanho granulométrico e razões de aquecimento. Portanto, esta droga vegetal caracterizada e padronizada é promissora para ser utilizada na forma de chá, pelos usuários do Sistema Único de Saúde do Brasil.

**Palavras-chave:** Chá; Ganulometria dos Pós; Quimiometria; Métodos analíticos.

## ABSTRACT

The use of natural products and herbal medicines is one of the factors that has driven the verification and correlation between popular knowledge and scientific data. In this perspective, *Schinopsis brasiliensis* E. is a tree widely used in traditional medicine for several pathologies, such as inflammation, infection, candidiasis, etc. The leaves of this species are used as raw material for the production of teas, however, it is necessary to standardize the vegetal drug as a way of guaranteeing quality, safety and efficacy, besides enabling the use of this species as a candidate for the development of herbal medicines. Therefore, the objective of this work was to analyze the vegetal drug produced by the leaves of *S. brasiliensis* in different granulometric sizes by analytical, physical-chemical, chemometric and biological methods. For this, the leaves were collected in the semi - arid region of Paraíba, were dried, pulverized and separated by granulometry of the powders. Experimental design was used to evaluate the antimicrobial profile through the microdilution method in broth, to evaluate the minimum inhibitory concentration. In the planning the sieve size and infusion concentration were the independent variables, which were analyzed using the near infrared spectrum. After the analyzes, the following chemometric techniques were applied: hierarchical group analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and soft independent modeling by class analogy (SIMCA). Optical microscopy was used to evaluate particle morphology and uniformity, as well as high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet spectroscopy for quantification of secondary metabolites and qualitative evaluation of chemical marker. Thermoanalytical methods were also applied to characterize the plant drug through thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA). As a result, the leaves had a potential antifungal effect against strains of *Candida* spp., and it was observed that the decrease and uniformity of particle size favors this action. The result is corroborated with the chemometric data that can separate the particles into small, medium and large. The morphological data presented the particles with uniform sizes, besides irregular surfaces. In relation to the chemical composition, it was possible to quantify the flavonoids content, tannins and in greater quantity, polyphenols, besides identifying gallic acid by HPLC. The thermoanalytical data also show that the thermal behavior of the particles presents uniform characteristics and variations according to the size and heating ratios. Therefore, this plant drug is promising in relation to studies of phytotherapeutic development, as well the analytical model presented can be used as tool for characterization of plant parts.

**Keywords:** Tea; Powder Granulometry; Chemometrics; Analytical Methods.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço à Deus por ter traçado um plano de vida para mim, de forma a ter conseguido ingressar e finalizar esse tão sonhado mestrado.

Em seguida a minha família, por estar sempre ao meu lado me aconselhando e me dando todo o suporte necessário que eu poderia ter. Em especial ao meu pai e a minha mãe por todo o amor, carinho e zelo que sempre tiveram por mim. A todas minhas irmãs que estiveram sempre ao meu lado em todas as dificuldades e alegrias, meu agradecimento especial a essa família, pois, ao seu modo sempre se orgulharam e confiaram em meu trabalho.

Aos meus amigos Simone, Romário e Alline, que desde criança estiveram ao meu lado partilhando de momentos tristes, felizes e difíceis, por sempre quererem o meu bem e me valorizarem como pessoa. Agradeço também a minha amiga Suenia, uma pessoa que a vida me presenteou para que pudéssemos partilhar segredos, emoções, experiências, aprendizado e uma grande cumplicidade que gerou um sentimento de amizade recíproca.

A minha orientadora Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros por todo o conhecimento partilhado durante os anos de convívio. Aos professores que compõem a banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem com este trabalho. E também a todos que compõem o Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, por tornarem possível a realização deste mestrado. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma lição de vida.

Muito obrigado.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ATCC	American type culture collection (Coleção de culturas tipo americanas)
CI	Concentração da infusão
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	Difenilpicrilhidralazina
DTA	differential thermal analysis (análise térmica diferencial)
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorption assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCA	Hierarchical cluster analysis (Análise de componentes hierárquicos)
IFAV	Insumo farmacêutico ativo vegetal
KNN	K-nearest neighbor (K-ésimo vizinho mais próximo)
MLR	Multiple linear regression (Regressão linear múltipla)
NIR	Near infrared (Infravermelho próximo)
PCA	Principal component analysis (Análise por componentes principais)
PCR	Principal component regression (Regressão por componentes principais)
PLS	Partial least squares (mínimos quadrados parciais)
SIMCA	Soft and independent modeling by class analogy (Modelagem independente e flexível por analogia de classe)
SUS	Sistema único de saúde
TG	Termogravimetria
TP	Tamanho granulométrico



## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Figura 1.** Distribuição natural da *S. brasiliensis* pelo Brasil.

**Figura 2.** Experimento com composto central com  $\alpha = \bar{2}$ .

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Superfície de resposta em três dimensões do efeito da *S. brasiliensis*.

**Figura 2.** Espectros brutos de variações granulométricas de matéria prima vegetal a partir de folhas de *S. brasiliensis* na região espectral de 2400 a 700  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 3.** Espectros pré-processados de variações granulométricas da matéria prima vegetal a partir de folhas de *S. brasiliensis* na região espectral de 2100 a 900  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 4.** Análise de Dendograma (HCA) para os diferentes tamanhos granulométricos da matéria prima vegetal de *S. brasiliensis* utilizando complete linkage e distância euclidiana.

**Figura 5.** Plotagem de pontos da PCA1 (99%) X PCA2 (1%) para as amostras de cinco tamanhos granulométricos de pó da folha de *S. brasiliensis*.

**Figura 6.** Scores para modelagem com conjunto de classificação com tamanhos granulométricos do pó das folhas de *S. brasiliensis*.

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Microscopia óptica de tamanhos granulométricos do pó de folhas de *S. brasiliensis*.

**Figura 2.** Cromatograma do componente químico ácido gálico presente nas folhas de *S. brasiliensis*.

**Figura 3.** Termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do pó das folhas de *S. brasiliensis*.

**Figura 4.** Curvas TG de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos na razão de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Granulometria dos pós das folhas de *S. brasiliensis*.

**Tabela 2.** Níveis e variáveis do planejamento composto central para cada microrganismo.

**Tabela 3.** Rendimento da granulometria do pós das folhas de *S. brasiliensis*.

**Tabela 4.** Análise de variância para *C. albicans* (11006).

**Tabela 5.** Análise de variância para *C. albicans* (90028).

**Tabela 6.** Análise de variância para *C. tropicallis* (750).

**Tabela 7.** Análise de variância para *C. krusei* (34135).

**Tabela 8.** Análise de variância para *C. glabrata* (10221).

**Tabela 9.** Taxa de hemólise da infusão de *S. brasiliensis* frente a hemácias.

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Perímetro médio da granulometria dos pós.

**Tabela 2.** Teor de metabólitos secundários presentes nas folhas de *S. brasiliensis*.

**Tabela 3.** Perda de massa da decomposição térmica das amostras de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos.

**Tabela 4.** Eventos endotérmicos da decomposição térmica das amostras de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
<b>3.1 Espécie <i>Schinopsis brasiliensis</i> E.</b> .....	15
3.1.1 <i>Etnofarmacobotânica</i> .....	15
3.1.2 <i>Caracterização química</i> .....	16
3.1.3 <i>Atividade biológica e farmacológica</i> .....	17
3.1.4 <i>Candidíase</i> .....	19
<b>3.3 Extração de metabólitos secundários</b> .....	20
3.3.1 <i>Métodos de extração da medicina popular</i> .....	20
3.3.2 <i>Métodos de extração industriais</i> .....	20
<b>3.4 Granulometria dos pós</b> .....	22
<b>3.6 Métodos analíticos utilizados no controle de qualidade de fitoterápicos</b> .....	22
3.6.1 <i>Espectroscopia</i> .....	23
3.6.2 <i>Cromatografia</i> .....	23
3.6.3 <i>Análise térmica</i> .....	24
<b>3.7 Otimização de processos</b> .....	25
3.7.1 <i>Planejamento composto central</i> .....	25
<b>3.8 Quimiometria</b> .....	26
3.8.1 <i>Grupamentos por métodos hierárquicos (HCA)</i> .....	27
3.8.2 <i>Análise de componentes principais (PCA)</i> .....	28
3.8.3 <i>Modelagem flexível independente por analogia de classe (SIMCA)</i> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>CAPÍTULO I: CLASSIFICAÇÃO QUIMIOMÉTRICA E PERFIL ANTIMICROBIANO DAS FOLHAS DE <i>Schinopsis Brasiliensis</i> ENGLER EM DIFERENTES GRANULOMETRIAS</b> .....	39
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	42
<b>2.1 Droga vegetal</b> .....	42

2.2 Obtenção de espectros NIR .....	42
2.3 Estudo quimiométrico .....	43
2.4 Planejamento experimental e análise estatística .....	43
2.5 Infusão.....	44
2.6 Análise antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	44
2.7 Atividade hemolítica <i>in vitro</i> .....	45
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
3.1 Granulometria dos pós .....	46
3.4 Estudo quimiométrico .....	47
3.4.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA) .....	48
3.4.2 Análise de componentes principais (PCA).....	49
3.4.3 Modelagem flexível independente por analogia de classe (SIMCA) .....	50
3.2 Atividade antimicrobiana.....	52
3.2.1 Análise de variância.....	52
2.2.2 Análise de regressão .....	55
2.2.3 Análise dos efeitos.....	55
3.3 Atividade de citotoxicidade em hemácias .....	57
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

**CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E TERMOANALÍTICA DA MATERIA PRIMA VEGETAL DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* EM DIFERENTES TAMANHOS GRANULOMÉTRICOS.....** 63

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>64</b>
<b>2.1 Obtenção da matéria prima vegetal .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2 Preparação do pó .....</b>	<b>64</b>
<b>2.3 Microscopia óptica .....</b>	<b>64</b>
<b>2.4 Análise fitoquímica quantitativa .....</b>	<b>64</b>
2.4.1 Determinação de polifenóis .....	65
2.4.2 Determinação de flavonoides.....	65
2.4.3 Determinação de taninos .....	65
<b>2.5 Análise cromatográfica.....</b>	<b>66</b>
<b>2.6 Análise termogravimétrica (TG) .....</b>	<b>66</b>
<b>2.8 Análise térmica diferencial (DTA) .....</b>	<b>66</b>

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>3.1 Microscopia óptica</b> .....	68
<b>3.2 Análise fitoquímica</b> .....	69
3.2.1 <i>Quantificação de metabólitos secundários</i> .....	69
3.2.2 <i>Análise cromatográfica</i> .....	71
<b>3.3 Análise térmica</b> .....	72
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

Inúmeros medicamentos são desenvolvidos a partir de matéria prima vegetal, todos eles ampliaram notavelmente o espectro de tratamento de enfermidades ou formas de prevenir doenças. Apesar da rapidez com que se introduzem novos agentes farmacológicos, a qualidade, segurança e eficácia precisam ser comprovadas e garantidas (FALZON; BALABANOVA, 2017).

No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para tratar infecções comuns. Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo no país, tornando-se um setor econômico importante devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde (LIMA *et al.* 2006). O processo mais simples para extração de compostos bioativos de uma droga vegetal é através de uma infusão, caracterizada como um processo de verter uma porção de planta pulverizada em água fervente. Este método é bastante utilizado pelas comunidades, desde as primeiras civilizações até os dias atuais (LI *et al.*, 2013). Existe também a recomendação da ANVISA, através da Resolução N° 10, de 9 de março de 2010, que instituí a utilização da droga vegetal no SUS na forma de chá, utilizando plantas medicinais ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas.

O consumo de produtos naturais tem crescido, mas este aumento não tem sido acompanhado na qualidade das matérias-primas disponíveis no mercado, como droga vegetal e insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV). Isto ocorre devido a obstáculos como, por exemplo, poucos parâmetros para o controle da qualidade dessas matérias-primas e a sua complexidade química (NASCIMENTO *et al.* 2008).

Na indústria farmacêutica, as plantas têm também contribuído significativamente, seja pelo uso de matérias-primas para o preparo de infusões ou através do isolamento de vários compostos bioativos, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente sua síntese orgânica (TROVÃO *et al.*, 2004).

Um exemplo de planta cujo conhecimento medicinal é disseminado no uso popular é a *Schinopsis brasiliensis* Engler (Anacardiaceae), bastante presente no nordeste do Brasil e conhecida popularmente como braúna, é uma planta pertencente ao bioma da Caatinga. Esta espécie é um exemplo de insumo vegetal utilizado no tratamento de candidíase e outras doenças infecciosas (CHAVES *et al.*, 2011; DONATI *et al.*, 2014). O trabalho desenvolvido

por Jovito *et al.* (2016) comprovou a ação antifúngica *in vitro* do extrato de *S. brasiliensis* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida krusei*.

A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, principalmente a espécie *Candida albicans*. Estes microrganismos atingem áreas como órgãos genitais, pele, unhas, garganta, boca e corrente sanguínea podendo causar pequenas ulcerações, lesões, coceiras e exsudato (GUANARA; NUCCI, 2018). Na medicina popular, o tratamento destas infecções é feito através de unguentos, pastas e chás de espécies vegetais com potencial efeito antifúngico (SHARMA *et al.*, 2017; DRAGOS; GILCA, 2018).

Diante disto, existe a necessidade de avaliar o perfil de ação biológica das infusões, levando em consideração parâmetros como a quantidade de planta utilizada e o grau de partição da droga vegetal, que são fatores considerados relevantes na produção de um chá. Além disso, o trabalho desenvolvido por Brandão *et al.* (2016) observou que as diferentes granulometrias da matéria prima de origem vegetal possuem significância na ação antimicrobiana e nos processos de caracterização físico-química.

Diversas ferramentas estatísticas e metodologias preparatórias e analíticas são utilizadas para caracterizar a droga vegetal, entre elas a granulometria dos pós, a espectroscopia, análise antimicrobiana *in vitro* por microdiluição em caldo, termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial. Apesar de serem técnicas bem sucedidas no ambiente científico e de inovação industrial, ainda existe a necessidade de criação de parâmetros e modelos analíticos eficazes para avaliação da qualidade e potência de matéria prima vegetal e fitoterápicos (SANDASI *et al.*, 2018).

Considerando a *S. brasiliensis* como uma espécie em potencial para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos como ação antifúngica, este trabalho a coloca como objeto de estudo e intenciona correlacionar variações de tamanho granulométrico com ação biológica e parâmetros analíticos para caracterização de droga vegetal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar por métodos analíticos, físico-químicos e biológicos a droga vegetal produzida pelas folhas da *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos.

### 2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) coletar as folhas da *S. brasiliensis* em organismos vegetais adultos;
- b) padronizar diferentes tamanhos de granulometrias;
- c) produzir infusão com todas as granulometrias em diferentes concentrações;
- d) avaliar a influência do tamanho de granulometria e da concentração da infusão na concentração inibitória mínima frente as cepas de fungos do gênero *Candida* spp., utilizando planejamento experimental;
- e) avaliar a taxa de hemólise causada pela infusão das folhas de *S. brasiliensis*;
- f) desenvolver modelo analítico quimiométrico para classificação dos tamanhos de partículas utilizando a espectroscopia de infravermelho próximo;
- g) determinar o tamanho médio das partículas e a morfologia por microscopia óptica;
- h) quantificar metabólitos secundários presentes nas folhas de *S. brasiliensis*;
- i) determinar qualitativamente o marcador químico das folhas de *S. brasiliensis* através de cromatografia líquida de alta eficiência;
- j) analisar físico-quimicamente as partículas, utilizando técnicas termoanalíticas.



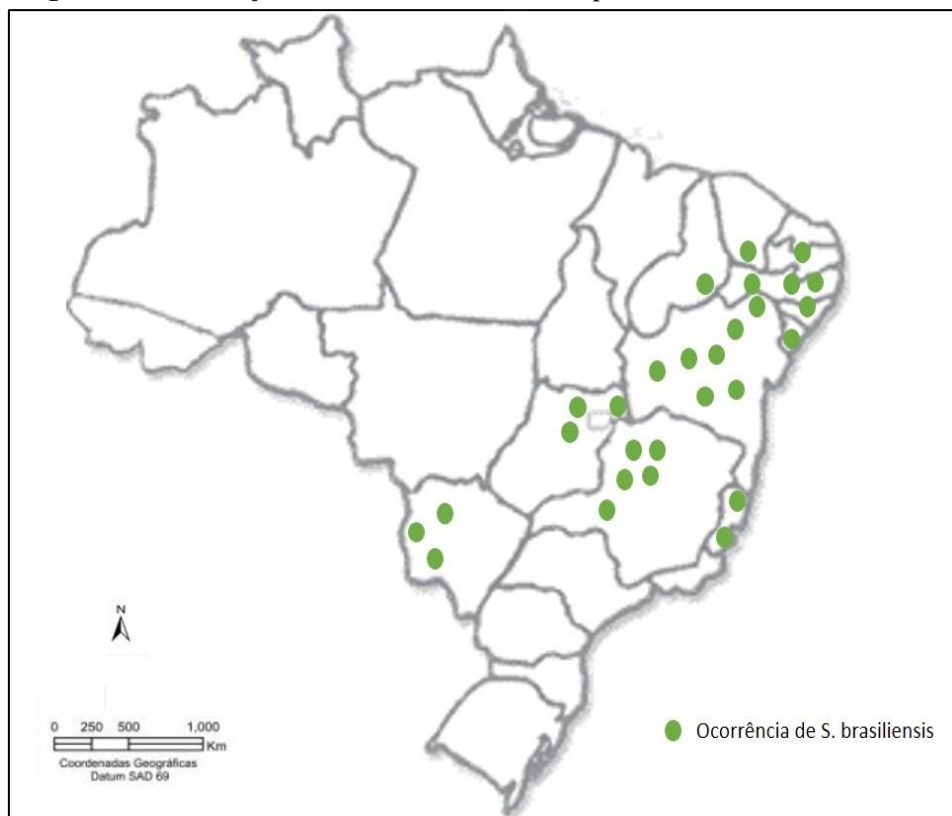
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Espécie *Schinopsis brasiliensis* E.

##### 3.1.1 Etnofarmacobotânica

A *Schinopsis brasiliensis* é uma representante da família Anacardiaceae, conhecida popularmente como baraúna, braúna, braúna-do-sertão, quebracho, soto, baraúva, braúna parda, chamacoco e pau preto (MOREIRA, 2016). Está presente em diversos biomas como Caatinga, Cerrado, Pantanal e Floresta tropical, portanto é frequente em diversas regiões da América do Sul. Na figura 1 é observado a distribuição desta espécie por todo o Brasil, sendo identificado os pontos de ocorrência natural (CARVALHO *et al.*, 2008). É uma árvore de grande porte, podendo chegar até 12m de altura, seus ramos possuem espinhos resistentes e suas folhas são de coloração verde escura, apresenta flores brancas e pequenas com pouco cheiro, seus frutos são vagens com apenas uma semente (LOPEZ, VILLALBA, 2016).

**Figura 1:** Distribuição natural da *S. brasiliensis* pelo Brasil.



Fonte: Embrapa Informação Tecnológica. Brasília. Espécies Arbóreas Brasileiras.

É uma espécie xerófita e heliófita, pois possui estruturas específicas como espinhos para sobreviver em regiões áridas e por necessitar de exposição prolongada ao sol para se desenvolver, respectivamente. Além disso, possui frutificação e maturação dos frutos em épocas variáveis do ano (MOREIRA, 2016).

Por possuir o tronco lenhoso, grosso e resistente, além da entrecasca ser utilizada popularmente para fins medicinais, esta espécie se tornou alvo de exploração madeireira e de investigação científica. Apresenta madeira de cerne duro e resistente a fungos xilófagos, além de suas folhas possuírem ações medicinais frente a infecções fúngicas. No entanto, o uso irracional a tornou integrante da lista de espécies ameaçadas de extinção no Brasil (OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2008).

A localização geográfica dos organismos vegetais da espécie *S. brasiliensis* é um fator pertinente a exploração das suas propriedades medicinais. Características como composição do solo, quantidades de precipitações de chuva, variações de temperatura e umidade do ar, além da idade da árvore e da escolha do órgão vegetal utilizado podem influenciar na produção de metabólitos e conseqüentemente na sua utilização pela medicina popular. (OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2008). A sua maior exploração ocorre em regiões áridas e semiáridas, por exemplo, na Caatinga (LOPEZ, VILLALBA, 2016).

O trabalho desenvolvido por Gonzaga *et al.* (2003) buscou alternativas para conservação desta espécie ameaçada de extinção. Uma forma indicada é a diminuição da umidade, como fim de aumentar a estabilidade e prolongar o tempo de vida útil de sementes da *S. brasiliensis*. A conservação de órgão vegetais na forma seca ou com utilização de nitrogênio líquido (crioconservação) pode ser extrapolada das sementes para outras partes vegetais como caule e folhas.

### 3.1.2 Caracterização química

Os estudos fitoquímicos realizados com a *S. brasiliensis*, utilizando variadas partes da planta como folhas, casca do caule e fruto, indicaram a presença de diversos metabólitos secundários com importância na medicina e no desenvolvimento de medicamentos, representados principalmente pelos polifenóis (MOREIRA, 2016).

O estudo realizado por Cardoso *et al.* (2005) evidenciou a presença de inúmeros compostos. Deste, foram isolados e identificados dois compostos, o metil-6-eicosanol-2-hidroxi-4-metoxibenzoato e o 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3- $\beta$ -ol. Estes compostos foram isolados e identificados utilizando espectroscopia de massa.

Na prospecção química realizada por Santos *et al.* (2017) avaliaram a presença de compostos fenólicos, elucidando, isolando e testando a atividade antioxidante e anticancerígena. Obtiveram como resultados a elucidação da estrutura química de 16 compostos fenólicos, entre eles o ácido gálico ligados a grupamentos de glicopiranosídeo, além da catequina, nikoenoside, schizandriside, entre outros. Estes metabólitos foram obtidos através de extração por maceração das cascas do caule de *S. brasiliensis*, utilizando um solvente hidroetanólico. Para a elucidação e separação foram utilizadas cromatografias líquidas acopladas a espectro de massa.

Em estudos semelhantes de prospecção química de compostos presentes nas folhas da *S. brasiliensis*, Donati *et al.* (2014) analisou o óleo essencial através de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa e identificou os seguintes compostos: estragol, cariofileno, humaleno, aromadendreno, pineno, mirceno, isocavetreno, eucaliptol, linalol, terpinenol, ledeno, globulol e guaiou. Estes compostos presentes no óleo essencial apresentaram alta atividade antioxidante e antimicrobianas frente a cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de atuar contra o fungo *Candida parapsilosis*.

Nesta perspectiva, Fernandes *et al.* (2015) desenvolveram e validaram um método analítico para caracterização química de um extrato vegetal da *S. brasiliensis*. O método através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectro ultravioleta permitiu identificar e quantificar o ácido gálico, além de indica-lo como marcador químico desta espécie vegetal.

A composição química da *S. brasiliensis* também foi avaliada por Moreira (2016) que em sua dissertação isolou e identificou compostos orgânicos a partir das frações hexânicas e diclorometânicas das folhas desta espécie. Os fracionamentos do extrato hexânico das folhas de *S. brasiliensis* possibilitou a identificação de dois triterpenos friedelina e  $\beta$ -amirina e dois fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e seu derivado glicosilado. Os fracionamentos do extrato diclorometânico levou a identificação do ácido gálico e do galato de metila, o qual foi isolado em grande rendimento, de 3 flavonoides, entre eles, tricetina-3'-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxiflavonol e a quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosídeo.

### 3.1.3 Atividade biológica e farmacológica

Na medicina popular, a aplicabilidade de extrato da *S. brasiliensis* é vasta, podendo ser utilizada para o tratamento de fraturas, dor, inflamação, tosse, diarreia, infecção bacteriana e

fúngica, parasitoses, tratamento de estresse, entre outras (AGRA *et al.* 2008; ALBUQUERQUE *et al.* 2007; CARDOSO, 2007; JOVITO, 2016; MOREIRA, 2016; SANTOS *et al.* 2018).

A ação antioxidante é encontrada em praticamente todos os compostos de origem vegetal. A *S. brasiliensis* já teve sua atividade antioxidante comprovada *in vitro* frente a radicais livres como difenilpicrilhidralazina (DPPH) e superóxido de hidrogênio (SARAIVA *et al.* 2011; SANTOS *et al.* 2018)

O trabalho desenvolvido por Santos *et al.* (2018) avaliou a ação anticancerígena em células das linhagens A549 (carcinoma alveolar basal humano) e em células do carcinoma epitelioide do cérvix humano (HELA) de 16 moléculas isoladas e não observou redução significativa do número de células. No entanto, todas apresentaram potencial antioxidante.

Já em relação a análise *in vivo*, a atividade anti-inflamatória foi comprovada em estudos realizados por Santos *et al.* (2018), através de modelos animais com ratos para avaliação de analgesia, antinocicepção e ação anti-inflamatória. O extrato hidroetanólico da *S. brasiliensis* foi avaliada na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> de peso de animal.

Outra ação biológica comprovada foi a atividade antibacteriana. Silva *et al.* (2015) e Chaves *et al.* (2015) observaram a capacidade bacteriostática dessa espécie frente a cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus*, além de avaliarem a capacidade de modulação da *S. brasiliensis* na atividade antimicrobiana de antibióticos como a eritromicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, levofloxacino, cefalotina e gentamicina. A ação antibacteriana também foi observada frente às cepas padronizadas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

A ação antifúngica também foi comprovada pelos estudos de Jovito (2016), que avaliou a ação das folhas desta espécie frente a cepas padronizadas do gênero *Candida* spp. e comprovou a ação antibiofilme frente a diversas cepas deste gênero, com ação comprovada em aproximadamente 6 h de atuação.

A segurança de utilização desta espécie vegetal é primordial, por isso estudos envolvendo toxicidade e citotoxicidade *in vitro* demonstram baixo nível de toxicidade, em todos os casos, sendo estudos preliminares que necessitam de maiores comprovações (SANTOS *et al.*, 2014; SARAIVA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2015).

Saraiva *et al.* (2012) em seus estudos desenvolveu uma microemulsão contendo o extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis*, comprovando sua atividade antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Além deste trabalho de desenvolvimento de microemulsão, Fernandes *et al.* (2013) também utilizou o

extrato seco das folhas como matéria prima vegetal para o estudo de caracterização físico-química através de técnicas termoanalíticas (Calorimetria exploratória diferencial e Termogravimetria), com o intuito de utilizá-la em estudos de pré-formulação.

### 3.1.4 Candidíase

A candidíase é uma infecção causada por qualquer uma das mais de vinte espécies do gênero *Candida* spp., tipo leveduriforme dos quais a mais comum e agressivo é a *Candida albicans*. Estes microrganismos atingem áreas como órgãos genitais, pele, unhas, garganta, boca e corrente sanguínea podendo causar pequenas ulcerações, lesões, coceiras e exsudato (TONG, TANG, 2017; GUARANA, NUCCI, 2018).

Os sintomas mais frequentes da candidíase são a dor e vermelhidão na região infeccionada, podendo também haver manchas brancas ou placas em áreas de mucosa. Quando presentes em órgãos genitais é frequente o aparecimento de coceira, vermelhidão e irritação, bem como pode ocorrer uma secreção branca e espessa no caso das mulheres e o inchaço, vermelhidão do pênis e prepúcio no caso dos homens (AIKAWA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

Estas infecções fúngicas podem acometer qualquer paciente, em qualquer faixa etária ou condição fisiológica, no entanto, paciente imunodeprimidos ou com o sistema imunológico ainda em desenvolvimento possuem maior disposição para desenvolver sintomas de candidíase. Os principais exemplos são pacientes com HIV positivo, crianças e internos hospitalares (JUD *et al.* 2017; SILVA *et al.* 2018).

O tratamento da candidíase é feito de forma a atuar frente a infecções sistêmicas ou infecções tópicas. O uso de antifúngicos orais como os derivados azol (fluconazol e itraconazol) são realizados em infecções sistêmicas, já para infecções superficiais, o uso tópico de nistatina, clotrimazol, miconazol e tinidazol são mais recorrentes (IRIYAMA *et al.* 2011; ABDELRAHMMAN *et al.* 2018). Estudos desenvolvidos por Tripathi *et al.* (2012) apontam que pode ser realizado o uso de antifúngicos de forma profilática em infecções fúngicas invasivas. O uso de antifúngicos já comercializados pode ser uma opção quando avaliada o risco e benefício de seu uso. Oro *et al.* (2015) em seus estudos avaliaram positivamente a utilização de compostos vegetais com ação antifúngica no tratamento e uso profilático de infecções caudadas por *Candida* spp. em pacientes portadores do HIV.

### 3.3 Extração de metabólitos secundários

#### 3.3.1 Métodos de extração da medicina popular

Na medicina popular, o uso mais comum de plantas é por via oral através dos chás. Quando aplicados diferenças na produção destes chás, temos a imersão de uma parte vegetal em uma água aquecida que pode ser chamada de infusão ou decocção. Além destas formas, as plantas medicinais também podem ser administradas de forma tópica, diretamente *in natura* na região que se deseja ou em forma de pastas e géis. Estes conhecimentos são repassados de geração para geração e é a base para inúmeras pesquisas de comprovação de eficácia farmacológica (FARZANEH; CARVALHO *et al.* 2015).

O uso de chá é muito comum, principalmente na forma de infusão que popularmente é realizada da seguinte forma: ervas frescas são colocadas em pequenos pedaços em uma xícara, em seguida é emergida em água fervente, que permanece em repouso por um período de 5 a 15 min, preferencialmente fechada para manter os vapores que possam ser emitidos. Esta técnica preserva os óleos essenciais das plantas e normalmente é aplicada para preparar chás a partir de folhas, flores e frutos moídos. A infusão é usada para fazer bebidas a partir de folhas, flores e frutos, e pode ser armazenada na geladeira e consumida em até 24 h (GUMUS *et al.* 2015).

Outra forma de utilização de plantas medicinais é através da decocção que é feita quando as partes da planta são fervidas juntamente com a água, durante 10 a 15 minutos. O uso da decocção é preferido quando se deseja preparar bebidas a partir de caules, raízes ou cascas das plantas, ou seja, órgãos com características lenhosas ou desidratadas (FOTAKIS *et al.* 2016).

Além disto, é comum o uso de cossolvente em extrações populares, como o uso de álcool ou vinho em garrafas, que consiste em colocar um mistura de raízes em contato com água, álcool e vinho, muitas vezes em concentrações aleatórias. Estes solventes permanecem em contato com as partes vegetais durante dias e após isto são filtradas e administradas via oral (MACIEL *et al.* 2002).

#### 3.3.2 Métodos de extração industriais

Diversos métodos extrativos são citados na Farmacopeia Brasileira como a maceração, extração por soxhlet e percolação. Além destes, a literatura científica e processos industriais utilizam formas extrativas como o ultrassom, fluido supercrítico e a turbólise. Estas técnicas são utilizadas pela indústria farmacêutica, entre outras finalidades, para extração de metabólitos oriundos de órgãos vegetais. No entanto, a escolha da metodologia de extração adequada depende de fatores como custo, rendimento, tempo e dos compostos que se deseja extrair (LOPEZ, VILLALBA, 2016; CHEN *et al.* 2018).

No processo de maceração, a matéria vegetal íntegra ou pulverizada é posta em contato com o solvente em um recipiente fechado ficando em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por um período de horas ou dias, com agitação em intervalos regulares, de modo que o solvente consegue interagir com a droga vegetal e extrair seus compostos (ALBUQUERQUE *et al.* 2018). Características negativas é que como não ocorre a renovação do solvente, pode ocorrer saturação do solvente utilizado e ocasiona uma baixa extração. Já as principais vantagens desse método consistem na sua fácil execução e no baixo valor agregado, pois utiliza vidrarias simples e apenas um volume de solvente (BELWAL *et al.*, 2018).

No processo extrativo por ultrassonificação são emitidas correntes de alta frequência utilizando-se um sonificador ou um banho de ultrassom para promover a fragmentação da estrutura celular da matéria prima vegetal, facilitando a liberação dos compostos químicos. Alguns fatores como solvente, tipo e quantidade de material vegetal podem ser alterados a fim de aperfeiçoar este método. Embora um método de rápida execução e com baixo custo, o seu uso pode sofrer interferência devido à interação entre a energia ultrassônica e os compostos presentes no material vegetal, podendo levar a formação de radicais livres e ao aumento da temperatura da solução extrativa. As principais vantagens desse método são a intensificação da transferência de massa, a promoção da ruptura da célula e demais estruturas celulares, e o aumento da penetração do solvente (CUNHA, FERNADES, 2018; SAJID *et al.*, 2018; DAS, EUN, 2018).

Já no processo de extração denominado turbolisação, a extração é exercida por forças de cisalhamento que reduzem o tamanho de partícula do material vegetal, fragmentando o conteúdo celular e favorecendo a troca de compostos entre a droga e a solução extratora. Este é o método mais rápido, no entanto envolve instrumentação e aquecimento. A turbolisação consiste em colocar a matéria prima vegetal em contato com o solvente escolhido e submetê-los ao movimento rotacional (cisalhamento) promovido por equipamentos como liquidificadores industriais e moinhos coloidais. A temperatura atingida e o pouco tempo de contato entre o órgão vegetal e a solução extratora são apontados como as principais

desvantagens dessa técnica, mas possui como vantagem o alto rendimento (DAS, EUN; 2018).

### **3.4 Granulometria dos pós**

O tamanho médio de grânulos é um parâmetro que influencia a solubilidade, a dissolução, a estabilidade, o potencial zeta, a superfície de contato e até mesmo a resposta biológica em organismos vivos e em experimentos *in vitro*. Estes e outros parâmetros estão intimamente ligados ao desenvolvimento de fitoterápicos. Desta forma, o controle da granulometria dos pós de drogas vegetais é um fator importante no processo de fabricação, pois a distribuição do tamanho das partículas é relacionada em vários estágios da produção (RAITHORE, PETERSON, 2018). O grau de redução do tamanho médio de partícula deve ser considerado no desenvolvimento de chás medicinais e de fitoterápicos segundo recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (HAN *et al.*, 2016).

Os pós são caracterizados com base em vários fatores, como formato, tamanho e distribuição de partículas, área superficial, fluidez, densidade aparente, densidade de compactação, compressibilidade e propriedades químicas. Entre estes, o tamanho de partícula e distribuição de tamanho com base na granulometria dos pós são os mais utilizados para caracterizar o pó, mas a escolha de qualquer técnica específica de caracterização de tamanho granulométrico é fortemente influenciada pela restrição em termos de exigência de velocidade de medição (NARASIMHAN, AMUDA, 2017).

Uma uniformização do tamanho de partícula de sólidos é normalmente obtida através pulverização e utilizando técnica de separação como a granulometria dos pós. Este processo permite obter partículas com características homogêneas, além de proporcionar uma diminuição do tamanho de partículas, como um aumento da superfície de contato (BOVENS *et al.*, 2014). Para pós de origem vegetal, a granulometria segue o mesmo princípio e os órgãos vegetais como folhas e cascas são requeridos na forma de pó com uniformização granulométrica (HAN *et al.*, 2016).

### **3.6 Métodos analíticos utilizados no controle de qualidade de fitoterápicos**

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para identificação, quantificação e avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos bem como da matéria prima vegetal utilizada na



sua produção. A mais utilizada e recomendada por compêndios oficiais é a espectrofotometria, porém observa-se uma variada possibilidade de métodos validados, como a cromatografia, imunoenaios, ressonância magnética nuclear e análise térmica, além de novos métodos utilizando marcadores químicos (LIANG *et al.*, 2004; MALAZY *et al.*, 2018; POHL *et al.*, 2018).

### 3.6.1 Espectroscopia

A espectroscopia compreende um conjunto de técnicas que utilizam a análise de espectros como ferramenta para caracterização de substâncias. A produção e a interpretação de espectros de cada substâncias originadas a partir da relação da mesma com a luz, traz informações e individualiza os compostos. Diversas metodologias são citadas e utilizadas no controle de qualidade de fitoterápicos que utilizam o conhecimento de absorção de luz, a exemplo temos as técnica de espectroscopia nas regiões do ultravioleta, visível, infravermelho, raio-x, etc (CHEN *et al.*, 2017).

Estas técnicas são as principais citadas no controle de qualidade de substâncias sintéticas e isoladas, no entanto sua utilização para produtos fitoterápicos possuem fins de investigação e caracterização. Existe a necessidade de fixação de provas analíticas específicas para produtos fitoterápicos. A principal vantagem das técnicas espectroscópicas está na rapidez de análises e a obtenção de dados com potencial confiabilidade (YANG; DENG, 2016).

O uso da espectroscopia na região do ultravioleta e visível pode ser citado na avaliação e quantificação de metabólitos secundários de extrações de espécies vegetais. Torna-se uma ferramenta de análise preliminar da composição química. Outras técnicas como utilizando o infravermelho e a espectroscopia de massa são mais sensíveis e possibilitam a elucidação de estruturas químicas complexas destes metabólitos (ANDRADE *et al.* 2018).

### 3.6.2 Cromatografia

A cromatografia é definida como uma técnica de separação que através de uma fase estacionária e uma fase móvel que consegue carrear compostos, proporcionando a separação dos mesmos por propriedades físico-químicas como tamanho, solubilidade, ionização, entre outras. Em termos analíticos esta técnica evoluiu muito nas últimas décadas e hoje são

relatadas diversas metodologias, como a cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, etc. Estas diversas técnicas aumentam o seu potencial analítico quando acopladas a instrumentos de identificação como espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear (CHENG *et al.*, 2018; SERESHTI *et al.*, 2018).

Alguns parâmetros são pontos de atenção no desenvolvimento de modelos analíticos envolvendo a cromatografia. São eles: polaridade da fase móvel; tamanho de partícula e polaridade da fase estacionária; método de detecção dos analitos. Para isso, recomenda-se utilização de parâmetros específico para cada analito em estudo (WANG *et al.* 2017).

Em relação a produtos de origem vegetal, existe uma grande complexidade química presente nas extrações e desta forma a abordagem da utilização da cromatografia é em identificar e quantificar um componente que esteja presente em todas as amostras, denominado marcador químico. Mais recente, existe também a definição de impressão digital de espécie vegetal, que utiliza entre outras metodologias a cromatografia para produzir um padrão químico de cada espécie, sem existir a necessidade de separar e identificar todos os compostos extraídos (XU *et al.*, 2006; SERESHTI *et al.*, 2018).

### 3.6.3 Análise térmica

A análise térmica pode ser definida como um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (CORREIA *et al.*, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2017). Estas técnicas são classificadas de acordo com a grandeza físico-química avaliada, a exemplo temos a termogravimetria (TG) que relaciona o aquecimento com a perda de massa, a calorimetria diferencial exploratória (DSC) ou a análise térmica diferencial (DTA) que avalia a variação de energia em relação a uma substância inerte (IONASHIRO, 2004).

Para garantir o máximo de confiabilidade nos estudos de análise térmica, são utilizados pelos menos duas técnicas, como forma de conflitar os dados obtidos. Estas técnicas são utilizadas no desenvolvimento e inovação de formulações farmacêuticas, incluindo as fitoterápicas. Podem ser aplicadas em estudo de estabilidade, pré-formulação, compatibilidade, controle de qualidade, entre outros (CORREIA *et al.*, 2015).

O trabalho desenvolvido por Brandão *et al.* (2016) utilizou as técnicas termoanalíticas amplamente difundidas pelo mundo para desenvolver um modelo analítico que caracteriza

matéria prima vegetal em diferentes tamanhos de partículas. O estudo mostra a capacidade que as propriedades físico-químicas possuem em serem alteradas por fatores como tamanho granulométrico.

### 3.7 Otimização de processos

Pesquisas com plantas medicinais geralmente envolvem a utilização de muitos recursos como tempo, mão de obra, dinheiro, bem como o estudo de diversas variáveis como quantidade de planta, a escolha do solvente e mesmo do procedimento extrativo, além de fatores como temperatura, instrumentação, umidade, qualidade, entre outros. Por isso, inúmeros esforços são reunidos no sentido de otimizar processos e observar a significância de cada variável, afim de diminuir custos, despesas e recursos para elaborar um trabalho cada vez com mais qualidade (WANG *et al.*, 2013).

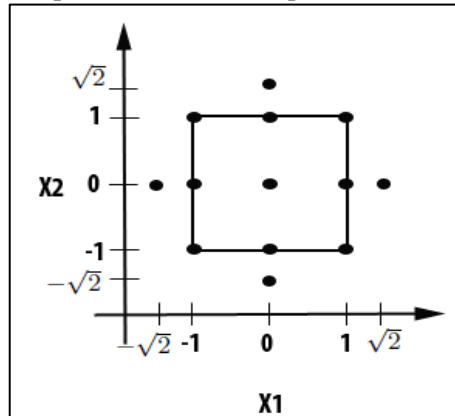
Neste contexto, o planejamento experimental aparece como uma ferramenta estatística capaz de amenizar tal problemática, maximizando os resultados e reduzindo os custos e tempo empregado. Essa ferramenta passou a ser amplamente aceita entre a comunidade científica, especialmente os de caráter fatorial, todavia não sendo uma regra, pois a escolha do melhor planejamento deve obedecer a necessidade e a conveniência da pesquisa e do pesquisador (CAMPOS *et al.*, 2006).

#### 3.7.1 Planejamento composto central

Os experimentos realizados utilizando o planejamento experimental de composto central são os mais populares dentre os planejamentos fatoriais de segunda ordem. Basicamente, estes experimentos são compostos de um ponto central, que será executado com réplicas e de pontos axiais, que irão determinar os termos quadráticos. Esses experimentos são de dois níveis totais ou fatoriais fracionados que foram aumentados com um pequeno número de tratamentos, cuidadosamente escolhidos, para permitir a estimativa do modelo de superfície de resposta de segunda ordem (KOMESU *et al.*, 2017; VELJKOVIC *et al.*, 2018).

O planejamento de experimento composto central segue uma organização como demonstrado na figura 2. Portanto, possuem os pontos fatoriais, os pontos axiais e as repetições no ponto central.

**Figura 2:** Experimento com composto central com  $\alpha = \sqrt{2}$ .



Fonte: Portal Action. DIGUP: Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística.

A principal aplicação do planejamento composto central é otimizar processos e obter como resposta uma superfície que demonstra um perfil do experimento estudado. Os estudos desenvolvidos por Raji *et al.* (2017) intencionaram otimizar a produção de pectina obtida através de sementes de melão. De forma semelhante Kola *et al.* (2017), otimizaram a biossíntese de ácido cítrico utilizando este planejamento de experimentos

### 3.8 Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como o uso de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento, a interpretação e a previsão em dados químicos. Desta forma, a busca por ferramentas capazes de converter conjuntos de dados no máximo de informação útil foi a causa principal do surgimento e rápido desenvolvimento da quimiometria (FERREIRA, 2015).

A aplicação da quimiometria na área de saúde pode ser exemplificada com sua atuação em química medicinal e computacional, a exemplos dos estudos de relação entre estrutura e atividade biológica de moléculas, que são úteis para o planejamento de fármaco. Atua também na elucidação de marcadores de doenças, além de se mostrar útil na indústria química, farmacêutica e de alimentos, que fazem parte do controle de qualidade e da tomada de decisões em otimizações de processos (HIDALGO *et al.* 2018).

Estudos realizados por Veras *et al.* (2010), Fernandes *et al.* (2011) e Gonzalez *et al.* (2018) exemplificam a aplicação de ferramentas químicas e matemáticas em espectros de infravermelho próximo, produzindo informações capazes de classificar amostras de biodiesel, óleos vegetais e matérias primas vegetais. Em concordância com esses estudos, Montemurro *et al.* (2016) utilizou dados de cromatogramas obtidos a partir de cromatografia líquida de alta

eficiência para quantificar com sensibilidade pesticidas em sucos de frutas, utilizando ferramentas quimiométricas. De forma semelhante, Almeida *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2015) classificaram bactérias e biodiesel, respectivamente, quando aplicaram técnicas quimiométricas em imagens digitais obtidas das amostras. Além disso, recentemente Panchuk *et al.* (2018) publicou uma revisão sobre os métodos quimiométricos mais utilizados para análise de dados químicos de origem nos difratogramas de raios-X.

Para que uma análise de dados químicos seja bem sucedida através de ferramentas quimiométricas, uma sequência de etapas devem ser realizadas. Inicialmente, a organização, a forma de visualização e o pré-processamento dos dados químicos são recomendados para que as informações possam ser utilizadas por softwares. Após isto, a próxima etapa é realizar uma análise exploratória de dados, ou seja, de forma não supervisionada reconhecer padrões e características pertinentes a cada amostra, esta etapa é primordial para a observação de classificação das amostras por similaridades e dissimilaridades. As principais técnicas empregadas para esta análise são a análise de componentes principais (PCA) e a agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA) (WANG *et al.*, 2018).

O próximo passo é desenvolver métodos de calibração multivariada, que tem como princípio criar uma relação entre os dados químicos e propriedades do interesse do pesquisados. As ferramentas mais utilizadas a regressão linear múltipla (MLR), a regressão de componentes principais (PCR) e a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) (FERREIRA, 2015).

Por outro lado, existem também os modelos supervisionados de reconhecimento de padrão em dados químicos. Eles são utilizados para construção de modelos qualitativos ou de classificação. Os métodos mais utilizados são o K-ésimo vizinho mais próximo (KNN) e a modelagem flexível independente por analogia de classe (SIMCA) (VERAS *et al.*, 2010).

### 3.8.1 Grupamentos por métodos hierárquicos (HCA)

A análise por grupamentos hierárquicos é um método “não supervisionado” para reconhecer padrões de comportamento de grupos de amostras. Na quimiometria estes padrões são analisados em dados químicos, no entanto a aplicação do HCA é ampla e envolve diversas áreas do conhecimento humano (GRANATO *et al.*, 2018).

O HCA permite reduzir dimensões e organizar amostras de acordo com suas distâncias entre as amostras. As similaridades e dissimilaridades entre as variáveis auxiliam nas distâncias e na forma de ligação. Esta organização resulta em uma árvore hierárquica

denominada dendograma, onde é possível observar agrupamentos de acordo com as características não supervisionada das amostras (CEBI *et al.*, 2017).

Alguns exemplos de distâncias utilizadas são euclidiana, *city-block manhattan*, *chebychev* e *1-pearson R*. Já alguns exemplos de tipos de ligações para formação dos dendogramas são o *single linkage* e o *complete linkage* e *ward's method*. Os tipos de ligações e as distâncias são combinadas como parâmetros de agrupamentos (FERREIRA, 2015). A aplicação da análise hierárquica é descrita em taxonomia, ciências forenses, classificação de alimentos e contaminantes, na indústria química e farmacêutica, além da classificação de matéria prima vegetal (JIN *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2015; SHEKARI *et al.*, 2018).

### 3.8.2 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é um método quimiométrico utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor. Desta forma, é utilizado para reduzir o espaço original do conjunto de dados sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Portanto, esta técnica tem como principal objetivo ampliar as informações relevantes do conjunto de amostras, tornando possível a avaliação visual (KARA, 2009; HAN *et al.*, 2018).

Utilizando esta técnica é possível visualizar, avaliar e interpretar as semelhanças e diferenças existentes entre as variáveis e desta forma obter relações entre as amostras. Permite também detectar amostras com comportamento atípico, pois na ampliação das informações isto fica evidente, tornando esta ferramenta útil em processos industriais para detecção de erros e falhas (FERREIRA, 2015; PORIZKA *et al.*, 2018).

Nesta perspectiva, a técnica PCA é que pode ser utilizada em produtos e matéria prima vegetal, como ferramenta de identificação de contaminantes ou adulterantes (FAN *et al.*, 2015). Exemplos são os estudos desenvolvidos por Kara (2009) que utilizou a PCA para avaliar a contaminação de chá por metais pesados, além disso o estudo realizado por Dastjerdi *et al.*, (2018) utilizou esta mesma técnica quimiométrica para avaliar adulterantes em suplementos para emagrecimento de origem vegetal.

### 3.8.3 Modelagem flexível independente por analogia de classe (SIMCA)

A SIMCA é uma ferramenta usada pela quimiometria para desenvolver um modelo de componentes principais que quando ajustado para cada classe de um conjunto de amostra

assume valores medidos para um grupo de distribuição uniforme. Portanto, é um modelo supervisionado de distribuição de amostras. Neste modelo, aumenta-se o número de amostras com distribuição uniforme e espera-se uma distribuição probabilística (MIAW *et al.*, 2018).

No SIMCA é possível avaliar o número de componentes principais para descrever uma classe, mas esta modelagem é qualitativa ou classificatória. Permite identificar classes de acordo padrões, mas as análises de regressão e quantificação necessita de modelos discriminatórios (MARQUEZ *et al.*, 2010).

A aplicação da SIMCA é ampla na quimiometria e envolve diversas áreas do conhecimento, entre eles o desenvolvido por Marquez *et al.* (2010) que observaram a presença de adulterantes em carne moída. Em um trabalho semelhante Miaw *et al.* (2018) observaram adulterantes em néctar de uva. Além disto, Galtier *et al.* (2011) classificaram petróleo bruto utilizando técnicas quimiométricas, como a SIMCA.

## REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMMAN, K.; EL-BEHAIRY, M. F.; ALSHERBINY, T. E. M. *In vitro* activity of dihydropyrazole derivatives against *Candida* species. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 56, n.1, p. 80-82, 2018.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P.; DE MEDEIROS, P. M.; DE ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; VAZQUES, J. A.; BARREIRO, M. F.; MARROS, L.; FERREIRA, C. F. R. Recovery of bioactive compounds from *Arbutus unedo* L. fruits: Comparative optimization study of maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Food Research International**, v. 109, n. 1, p. 455-471, 2018.
- ALMEIDA, V. E.; COSTA, G. B.; FERNANDES, D. D. S.; DINIZ, P. H. G. D.; BRANDÃO, D.; MEDEIROS, A. C. D.; VERAS, G. Using color histograms and SPA-LDA to classify bacteria. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 406, n. 1, p. 5989-5995, 2014.
- ANDRADE, C. G.; SOUZA, L. M.; MURADOR, D. C.; BRAGA, A. R. C.; ROSSO, V. V. R.; ALMEIDA, O. J. G.; VILEGAS, W. Application of electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting associated with macroscopic and histological analysis for *Plantago major* herbal infusions quality control. **Food Research International**, v. 107, n. 1, p. 314-324, 2018.
- AIKAWA, N. E.; ROSA, D. T. A.; DEL NEGRO, G. M. B.; MORAES, J. C. B.; RIBEIRO, A. C. M.; SAAD, C. G.; SILVA, C. A. S.; BONFÁ, E. Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 6, p. 478-482, 2016.
- BELWAL, T.; EZZAT, S. M.; RASTRELLI, L.; BHATT, I. D.; DAGLIA, M.; BALDI, A.; DEVKOTA, H. P.; ORHAN, I. E.; PATRA, J. K.; DAS, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GOMEZ, L. G.; NABAVI, J. K.; NABAVI, S. M.; ATANASOV, A. G. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 82-102, 2018.
- BOVENS, M.; CSESZTREGI, T.; FRANC, A.; NAGY, J.; DUJUORDY, L. Sampling of illicit drugs for quantitative analysis- Part II. Study of particle size and its influence on mass reduction. **Forensic Science International**, v. 234, n. 1, p. 174-180, 2014.
- BRANDÃO, D. O.; GUIMARÃES, G. P.; SANTOS, R. L.; RAMOS-JÚNIOR, F. J. L.; SILVA, K. M. A.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. e7528297, 2016.



CAMPOS, L.F.A.; AMORIM, L.V.; FERREIRA, H.C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte I: composições binárias. **Cerâmica**, v.52, p.69-75, 2006.

CARDOSO, M. P. **Estudo Fitoquímico do caule de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardeacea)**. 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural Products Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 19, n. 5, p. 431-433, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas. 2008.

CEBI, N.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v.229, n. 1, p.517-526, 2017.

CHAVES, T. P.; DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; VIEIRA, K. V. M.; CLEMENTINO, E. L. C., COSTA, L. S. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 11-17, 2011.

CHAVES, T. P.; BARBOSA, A. L.; NUNES, L. E.; SILVA, K. M. A. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 33, p. 843, 849, 2015.

CHENG, S.C.; BHAT, S. M.; LEE, C. W., SHIEA, J. Thin Layer Chromatography Combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Characterizing Herbal Compounds. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 77, n. 5, 1207-1215, 2005.

CHEN, D. D.; XIE, X. F.; AO, H.; LIU, J. L.; PENG, C. Raman spectroscopy in quality control of Chinese herbal medicine. **Journal of the Chinese Medical Association**, v, 80, n. 1, p. 288-296, 2017.

CHEN, S.; SHANG, H.; YANG, J.; LIA, R.; WU, H. Effects of different extraction techniques on physicochemical properties and activities of polysaccharides from comfrey (*Symphytum officinale* L.) root, **Industrial Crops & Products**, v. 121, n. 1, p. 18-25, 2018.

COSTA, G. B.; FERNANDES, D. D. S.; ALMEIDA, V. E.; ARAUJO, T. S.; MELO, J. P. DINIZ, P. H. G. D.; VERAS, G. Digital image-based classification of biodiesel. **Talanta**, v. 139, n. 1, p. 50-55, 2015.

CORREIA, P. L.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, C. P.; SANTOS, A. F. O.; CAVALCANTE, H. M. M.; MACÊDO, R. O. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1691–1698, 2013.

CORREIA, P. L.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, C. P.; PINTO, M. F.; MOURA, E. A.; SANTOS, A. F. O.; MACÊDO, R. O. Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 122, n. 1, p. 207–214, 2015.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 225-239, 2018.

DAS, P. R.; EUN, J. B. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, v. 253, n. 1, p. 22-29, 2018.

DASTJERDI, A. G.; AKHGARI, M.; KAMALI, A.; MOUSAVI, Z. Principal component analysis of synthetic adulterants in herbal supplements advertised as weight loss drugs. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 31, n.1, p. 236-241, 2018.

DONATI, M.; MONDIN, A.; CHEN, Z.; MIRANDA, F. M.; FROLDI, G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, v. 12, n. 44, p. 1- 10, 2014.

DRAGOS, D.; GILCA, M. Taste of Phytocompounds: A better predictor for ethnopharmacological activities of medicinal plants than the phytochemical class? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, n. 1, p. 129-146, 2018.

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy an Introduction to Herbal Medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 1, p. 217-227, 2017.

FAN, Q.; CHEN, C.; HUANG, Z. ZHANG, C.; LIANG, P.; ZHAO, S. Discrimination of *Rhizoma gastrodiae* (Tianma) using 3D synchronous fluorescence spectroscopy coupled with principal component analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, n. 1 p. 1621-1625, 2015.

FARZANEH, V.; CARVALHO, I. S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, n. 1, p. 247-258, 2015.

FERNANDES, D. D. S.; GOMES, A. A.; COSTA, G. B.; SILVA, G. W. B.; VERAS, G. Determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends using NIR and visible spectroscopy with variable selection. *Talanta*, v. 18, n. 1, p. 30-34, 2011.

FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS, R. L.; CORREIA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M. MACEDO, R. O.; MEDEIROS, A. C. D. Thermal Characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 1, p. 443-447, 2013.

FERNANDES, F. H. A.; BATISTA, B. S. A.; MEDEIROS, F. D.; SANTOS, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 208- 211, 2015.

FOTAKIS, C.; TSIGRIMANI, D.; TSIKA, T.; LANTZOURAKI, D. Z.; STRATI, I. F.; MAKRIS, C.; TAGKOULI, D.; PROESTOS, C.; SINANOGLU, V. J. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. **Food Chemistry**, v. 211, n. 1, p. 963-971, 2016.

GALTIER, O.; ABBAS, O.; DRÉAU, Y.L.; REBUFA, C.; KISTER, J.; ARTAUD, J; DUPUY, N. Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n.1, p. 132-140, 2011.

- GONZAGA, T. W. C.; MATA, M. E. R. M. C.; SILVA, H. DUARTE, M. E. M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003.
- GONZALEZ, M. F.; BELIDO, E. E.; GUETO, L. G.; PALMAN, N.; BARROSO, C. G.; BARBERO, G. F. Rapid quantification of honey adulteration by visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics. **Talanta**, v. 188, n. 1, p. 288-298, 2018.
- GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v.72, n. 1 p. 83-90, 2018.
- GUANARA, M.; NUCCI, M. Acute disseminated candidiasis with skin lesions: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 1, n. 1, 2018.
- GUMUS, Z. P.; GULER, E.; DEMIR, B.; BARLAS, F. B.; YAVUZ, M.; COLPANKAN, D.; SENISK, A. M.; TEKSOZ, S.; UNAK, P.; COSKUNO, H.; TIMUR, S. Herbal infusions of black seed and wheat germ oil: Their chemical profiles, in vitro bio-investigations and effective formulations as Phyto-Nanoemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, n. 1, p. 73-80, 2015.
- HAN, X.; HU, M.; YANG, Z.; ZANG, D. K. *et al.* Comprehensive evaluation of powdered Chinese herbal medicines – An exemplification of *Isatidis radix*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 8, n. 3, p. 286-292, 2016.
- HAN, L.; WU, Z.; ZENG, K.; YANG, X. On line multilinear principal component analysis. **Neurocomputing**, v. 275, n. 1, p. 888-896, 2018.
- HIDALGO, M. J.; POZZI, M. T.; FURLONG, O. J.; MARCHEVSKY, E. J.; POLLERANO, R. G. Classification of organic olives based on chemometric analysis of elemental data. **Microchemical Journal**, v. 142, n. 1, p. 30-35, 2018.
- IRIYAMA, N.; MATSUKAWA, Y.; MIURA, K.; INOMATA, H.; HIRABAYASHI, Y.; HATTA, K. Efficacy and safety of antifungal prophylaxis with oral itraconazole solution among patients receiving corticosteroids: who should be given prophylaxis? **Journal of Infection Chemotherapy**, v 17, n.1, p. 744-749, 2011.
- JIN, L.; LI, X.; TIAN, D.; FANG, X.; YU, Y.; ZHU, H.; GE, Y.; MA, G.; WANG, W.; XIAO, W.; LI, M. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. **Industrial Crops and Products**, v.87, n.1, p. 198-209, 2016.
- JOVITO, V. C. **Atividade anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl.** 2016. 47f. Dissertação (Mestrado em odontologia) –Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- JUD, P.; VALENTIN, T.; REGAUER, S.; GARY, T.; HACKL, G.; RIEF, P.; BRODMANN, M.; HAFNER, F. Invasive *Candida krusei* infection and *Candida vasculitis* of a leg ulcer in an immunocompetent patient: A case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 55, n. 1, p. 96-98, 2017.
- KARA, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 114, n.1, p. 347-354, 2009.

- KOMESU, A.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. Central composite experimental design applied to evaluate the lactic acid concentration by short path evaporation. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v.117, n.1, p.89-94, 2017.
- KOLA, A. K.; MEKALA, M.; KOLI, V. R. Experimental design data for the biosynthesis of citric acid using Central Composite Design method. **Data in Brief**, v.12, n. 1, p. 234-241, 2017.
- LI, S.; LI, S. K.; GAN, R. Y.; SONG, F. L.; KUANG, L.; LI, H. B. Antioxidant capacities and total phenolics contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 51, n. 1, p. 289-298, 2013.
- LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1, p. 53-70, 2004.
- LIMA, E. O. *et al.* avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**. v.16, n. 7-8. 2004.
- LIN, Y.; HO, Y.; ZHAO, Y.; CHANG, Y. Quality assessment of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* sold in Taiwan markets using a validated HPLC-UV method combined with hierarchical clustering analysis. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 23, n.1, p.130-135, 2015.
- LOPEZ, L.; VILLALBA, R. An assessment of *Schinopsis brasiliensis* Engler (Anacardiaceae) for dendroclimatological applications in the tropical Cerrado and Chaco forests, Bolivia. **Dendrochronologia**. v. 40, n. 1, p. 85-92, 2016.
- NARASIMHAN, K. S.; AMUDA, M. O. H. Powder Characterization. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, v. 1, n.1, p. 472-474, 2017.
- NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2008.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MALAZY, O. T. M.; SHADMAN, Z.; EJTAHED, H. S.; ATLASI, R.; ABDOLLAHI, M.; LARIJANI, B. Quality of reporting of randomized controlled trials of herbal medicines conducted in metabolic disorders in Middle East countries: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 2018.
- MARQUEZ, O. G. M.; VELÁZQUEZ, T. G.; REVILLA, G. O. Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. **Meat Science**, v. 86, n.1, p. 511-519, 2010.
- MEDEIROS, A. C. D.; CORREIA, L. P. C.; SIMÕES, M. O. S. S.; MACÊDO, R. O. Technological Quality Determination of Pharmaceutical Disintegrant by DSC Photovisual., **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 88, n. 2, p. 311-315, 2017.
- MIAW, C. S. W.; SENA, M. M.; SOUZA, S. V. C.; CALLAO, M. P.; RUISANCHEZ, I. Detection of adulterants in grape nectars by attenuated total reflectance Fourier-transform

mid-infrared spectroscopy and multivariate classification strategies. **Food Chemistry**, v. 266, n. 1, p. 254-261, 2018.

MONTEMURRO, M.; PINTO, L.; VERAS, G.; GOMES, A. A.; CULZONI, M. J.; GOICOECHEA, H. C. Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. **Talanta**, v. 154, n. 1, p. 208-218, 2016.

MOREIRA, B. O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl. (anacardiaceae)**. 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

OLIVEIRA, M. C. P.; OLIVEIRA, G. J. Superação da dormência de sementes de *Schinopsis brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 251-254, 2008.

ORO, D.; HEISLER, A.; ROSSI, E. M.; SCAPIM, D.; MALHEIROS, P.S.; BOFF, E. Antifungal activity of natural compounds against *Candida* species isolated from HIV-positive patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 781-784, 2015.

PANCHUK, V.; YAROSHENKO, I. ANDREY, L. SEMENOV, V. KIRSANOV, D. Application of chemometric methods to XRF-data e a tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, DOI: 10.1016/j.aca.2018.05.023, 2018.

POHL, P.; POHL, A. B.; DZIMITROWICZ, A.; GREDA, K.; JAMROZ, P.; LESNIEWICZ, A.; MADEJAA, S. A.; WELNA, M. Understanding element composition of medicinal plants used in herbalism—A case study by analytical atomic spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 159, n. 1, p. 262-271, 2018.

POŘÍZKA, P.; KLUS, J.; KÉPEŠ, E.; PROCHAZKA, D.; HAHN, D. W.; KAISER, J. On the utilization of principal component analysis in laser-induced breakdown spectroscopy data analysis, a review. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 148, n. 1, p. 65-82, 2018.

RAITHORE, S.; PETERSON, D. G. Effect of polyol type and particle size on flavor release in chewing gum. **Food Chemistry**, v. 253, n. 1, p. 293- 299, 2018.

RAJI, Z.; KLIDAIYAN, F.; REZAEI, K.; KIANI, H.; HOSSEINI, S. S. Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, n.1, p. 709-716, 2017.

SAJID, M.; WASYLKA, J. P. Combined extraction and microextraction techniques: Recent trends and future perspectives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 74-86, 2018.

SANDASI, M.; CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. Non-destructive quality assessment of herbal tea blends using hyperspectral imaging. **Phytochemistry Letters**, v. 24, n. 1, p. 94-101, 2018

SANTOS, C. C. S.; ARAUJO, S. S.; SANTOS, A. L. L. M. *et al.* Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fraction. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1 p. 298-303, 2014.

- SANTOS, C. C. S.; MASULLO, M.; CERULLI, A.; MARI, A. *et al.* Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, v. 140, n. 1, p. 45- 51, 2017.
- SANTOS, C. C. S.; GUILHON, C. C.; MORENO, D. S. A.; ALVIANO, C. S.; ESTEVAM, C. S.; BRANK, A. F.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidante properties of *Schinopsis brasiliensis* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 213, n. 1, p. 176-182, 2018.
- SARAIVA, A. M. **Avaliação da atividade biológica de extratos metanólicos de *Schinopsis brasiliensis* Engl. em sistemas microemulsionados**. 2012. 151f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE.
- SARAIVA, A. M.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P. PEIXOTO, T. J. S. *et al.* *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724, 1731, 2011.
- SERESHTI, H.; POURSORKH, Z.; ALIAKBARZADEH, G.; ZARRE, S. Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. **Food Control**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2018.
- SHARMA, A.; VALLEJO, R. C.F.; TAKETA, A. C. CILLAREAL, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208, n.1, p. 264-329, 2017.
- SHEKARI, N.; VOSOUGH, M.; HEIDAR, K. T. Chromatographic fingerprinting through chemometric techniques for herbal slimming pills: A way of adulterant identification. **Forensic Science International**, v. 286, n.1, 213-222, 2018.
- SILVA, M. S. P. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012.
- SILVA, K. M. A.; CHAVES, T. P.; SANTOS, R. L.; BRANDÃO, D. O.; FERNANDES, F. H. A.; SANTOS, V. L.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 2, p. 92- 98, 2015.
- SILVA, J. J.; SILVA, T. A.; ALMEIDA, H.; NETTO, M. F. R.; CERDEIRA, C. D.; HOFLING, J. F.; BORIOLLO, M. F. G. Candida species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. 1, p. 203-215, 2018.
- TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**, v.198, n.1, p. 27-35, 2017.
- TRIPATHI, N.; WATT, K.; BENJAMIN-JUNIOR, D.K. Treatment and Prophylaxis of Invasive Candidiasis. **Seminars in Perinatology**, v. 36, n. 6, p. 416-23, 2012.
- TROVÃO, D. M. *et al.* Estudo comparativo entre três fisionomias da caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Revista de Biologia e ciências da terra**. v. 4, n.2, 2004.

XU, C. J.; LIANG, Y. Z.; CHAU, F. T.; HEYDEN, Y. V. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1, p. 253–259, 2006.

YANG, Y.; DENG, J. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 68-88, 2016.

VELJKOVIĆ, V. B.; VELIČKOVIĆ, A. V.; AVRAMOVIĆ, J.M.; STAMENKOVIĆ, O. S. Modeling of biodiesel production: Performance comparison of box–Behnken, face central composite or full factorial design. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2018.

VERAS, G.; GOMES, A. A.; SILVA, A. C. BRITO, A. L. B.; ALMEIDA, P. B. A., MEDEIROS, E. P. Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 565-568, 2010.

WANG, C.; SHI, L.; FAN, L.; DING, Y.; ZHAO, S. LIU, Y.; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p.587-594, 2013.

WANG, X.; VEERDONK, F. L. V.; NETEA, M. G. Basic Genetics and Immunology of Candida Infections. **Immunology of Candida Infections**, v. 30, n. 1, p. 85–102, 2016.

WANG, Y. P.; ZOU, Y. R.; SHI, J. T.; SHI, J. Review of the chemometrics application in oil-oil and oil-source rock Q5 correlations. **Journal of Natural Gas Geoscience**, v. 1, n.1, p. 1-16, 2018.

WANG, F.; WANG, B.; WANG, L.; XIONG, Z. Y.; GAO, W.; LI, P.; LI, H. J. Discovery of discriminatory quality control markers for Chineseherbal medicines and related processed products by combination of chromatographic analysis and chemometrics methods: Radix *Scutellariae* as a case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, n. 1, p. 70-79, 2017.

# CAPÍTULO 1

**CLASSIFICAÇÃO QUIMIOMÉTRICA E PERFIL ANTIMICROBIANO DAS  
FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER EM DIFERENTES  
GRANULOMETRIAS**



**Classificação Quimiométrica e Perfil Antimicrobiano das Folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler em Diferentes Granulometrias**

Jocimar da Silva Santos, José Germano Vêras Neto, Ana Claudia Dantas de Medeiros

**RESUMO**

A comprovação científica da eficácia e segurança de plantas medicinais inicia com a observação do conhecimento popular. Um exemplo é o uso das folhas de *Schinopsis brasiliensis*, que são utilizadas pulverizadas e em forma de chá por comunidades para o tratamento de candidíase e outras doenças infecciosas e inflamatórias. Desta forma, este trabalho tem como objetivo classificar a droga vegetal a partir das folhas desta espécie através da análise multivariada de espectros de infravermelho próximo e também pela atividade antifúngica. Para isto, foi utilizado o planejamento experimental de composto central com análise de superfície de resposta, para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de microdiluição em caldo, testando a ação de infusões em diferentes concentrações e tamanhos granulométricos da matéria prima vegetal frente a 5 cepas padronizadas de *Candida* spp., principais causadoras de candidíase. Enquanto que, para análise multivariada de espectros no infravermelho, foram utilizadas as técnicas de classificação por Análise de Grupos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA), além da técnica de Modelagem Flexível Independente por Analogia de Classe (SIMCA), utilizando os softwares estatísticos *The Unscrambler* e *Statistic*. Como resultado observou-se que o tamanho granulométrico (TP) e a concentração da infusão (CI) são variáveis significativas em relação a atividade antimicrobiana da *S. brasiliensis* frente a cepas do gênero *Candida* spp., evidenciando que a CIM diminui com a diminuição do TP e a CI. Em relação a caracterização granulométrica, utilizando análise multivariada, foi possível separar os espectros das partículas em pequenas, médias e grandes, evidenciando que as técnicas de HCA, PCA e SIMCA são efetivas na classificação de tamanhos granulométricos de matéria prima vegetal. Desta forma a utilização de técnicas de rápida execução, com baixo custo e de forma não-destrutiva da amostra são favoráveis na caracterização de matéria prima vegetal, podendo ser estendida para controle de qualidade deste insumo.

**Palavras-chave:** Quimiometria. Infusão. Tamanho Granulométrico.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas por diversas populações ao redor do mundo, pois existe uma longa tradição do uso e facilidade de obtenção das plantas medicinais, que hoje em dia são comercializadas em feiras livres, mercados e lojas de produtos naturais de grandes e pequenas cidades (LIANG *et al.*, 2004). A preparação de chá é uma técnica popularmente utilizada para extrair metabólitos de partes vegetais. As plantas são utilizadas pelas comunidades sem parâmetros ou critérios científicos, no entanto este conhecimento popular contribui e incentiva a comprovação e o desenvolvimento de fitoterápicos. Um fator importante na infusão é o tamanho granulométrico da matéria prima vegetal, pois a uma redução no tamanho das partículas pode afetar a estrutura do material orgânico, a porosidade, área de superfície, levando a mudanças nas características físico-químicas e funcionais (MA, MU, 2016).

Um exemplo de planta medicinal é a espécie *Schinopsis brasiliensis*, presente em diversas regiões do Brasil, sendo uma árvore de grande porte e possui constituintes químicos importantes em suas folhas e casca do caule, como o ácido gálico e a quercetina. Este é uma exemplo de planta que possui ampla utilização na medicina popular, pois suas folhas possuem ação antifúngica, que pode ser aplicada de forma tópica ou sistêmica contra fungos do gênero *Candida* spp., no entanto seu uso deve ser monitorado, afim de garantir eficácia, segurança e qualidade (SANTOS *et al.* 2017).

Esta espécie vegetal possui ação antimicrobiana frente bactérias e fungos, como observado nos trabalhos de Silva *et al.* (2015), Chaves *et al.* (2011) e Chaves *et al.* (2015) a ação desta espécie frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Enquanto que, ação antifúngica também foi comprovada como proposto no trabalho desenvolvido por Jovito (2016). Estes trabalhos incentivam a avaliação de um perfil antimicrobiano, que indique condições satisfatórias de tamanho granulométrico e concentração de infusão para explorar a máxima ação antifúngica, porém de forma segura.

Como ferramenta analítica, a espectroscopia de infravermelho é uma técnica bastante utilizada para o controle de qualidade e caracterização de substâncias. Em relação a produtos de origem vegetal a complexidade química é um fator importante e a utilização de espectros de infravermelho próximo (NIR) como base de dados químicos para aplicação de técnicas de reconhecimento de padrão e classificação química tem se tornado uma ferramenta útil. A correlação entre atividades biológicas, características físico-químicas e espectros de NIR pode

auxiliar em maior segurança e rapidez nos testes de qualidade de fitoterápicos (DASTJERDI *et al.*, 2018). A utilização de técnicas quimiométricas como a classificação por Análise de Grupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA), além da técnica de Modelagem Flexível Independente por Analogia de Classe (SIMCA) estão crescendo nas últimas décadas como ferramenta de caracterização de compostos de origem orgânica (WANG *et al.*, 2018).

Portanto, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas quimiométricas com fins de separação e classificação dos diferentes tamanhos granulométricos produzidos a partir de matéria prima vegetal, além de avaliar o perfil antifúngico das folhas da *S. brasiliensis*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Droga vegetal

As folhas da espécie *S. brasiliensis* foram coletadas na região semiárida da Paraíba, Brasil (S 07° 04' 36" - W 36° 03' 40"). Foram seccionadas a partir de organismos adultos, as exsiccatas foram confeccionadas, identificadas e depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes, da Universidade Federal da Paraíba sob número EAN-14049.

Inicialmente a droga vegetal foi acondicionada em estufa de circulação de ar em temperatura de 40 °C ( $\pm 1$  °C) até a estabilização da umidade por um período de 5 a 7 dias. Em seguida foi pulverizada utilizando moinho de facas e peneira de 10 mesh. O pó resultante foi fracionado utilizando a técnica de granulometria dos pós descrita na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, volume 2 (2010).

A granulometria dos pós, com auxílio de um tamisador, permitiu separar 100 g da droga vegetal em seis diferentes tamanhos de grânulos, como demonstrado na tabela 1. Cada tamanho granulométrico foi nomeado com a letra P, de forma que P1 corresponde as maiores partículas e P6 as menores.

**Tabela 1:** Granulometria dos pós das folhas de *S. brasiliensis*.

<b>Partícula</b>	<b>Mesh</b>	<b>Tamanho (mm)</b>
P1	25	> 0,707
P2	45	0,420 – 0,706
P3	80	0,177 – 0,419
P4	100	0,149 – 0,176
P5	200	0,075 – 0,148
P6	400	0,037 – 0,074

### 2.2 Obtenção de espectros NIR

Os espectros de absorção na região do infravermelho próximo foram obtidos através de espectrofotômetro modelo Perkin Elmer Lambda 750, na região de 2500 – 700  $\text{cm}^{-1}$ . Para isto, foi utilizado o porta amostra apropriado para leitura de sólidos (pó). A droga vegetal foi analisada em 12 replicatas. Os dados obtidos foram analisados por técnicas de reconhecimento de padrão quimiométrico e de classificação, onde o software *Statistics 7.0* foi utilizado para as análises de grupamentos hierárquicos (HCA) e o software *The Unscrambler*

9.7 para as análises de componentes principais (PCA) e a modelagem flexível independente por analogia de classe (SIMCA) (VERAS *et al.*, 2010).

### 2.3 Estudo quimiométrico

O conjunto de amostras foi constituído de 12 amostras de cada tamanho de grânulo obtido na granulometria dos pós. Os espectros foram pré-processados selecionando uma faixa de comprimentos de onda,  $2400 - 700 \text{ cm}^{-1}$  como uma região de trabalho. Para remover ruído os espectros foram então tratados usando suavização por polinômio móvel, com não ponderação de variáveis ou amostras e eliminando dados anômalos. As análises de HCA e PCA foram aplicadas as matrizes de dados para avaliação de similaridades e dissimilaridades entre as amostras nas diferentes granulometrias.

Os dendogramas de HCA foram realizados testando os tipos de ligações: *single linkage*, *complete linkage* e *ward's method*. As distâncias entre os agrupamentos foram euclidiana, *city-block manhattan*, *chebychev* e 1-pearson R. O modelo de classificação do PCA foi validado por procedimento de validação cruzada (*leave-one-out*). O modelo SIMCA foi construído a partir de um conjunto de treinamento e classificação. O conjunto de classificação foi constituído de 7 a 10 espectros para cada tamanho granulométrico (VERAS *et al.*, 2010).

### 2.4 Planejamento experimental e análise estatística

A otimização do extrato vegetal foi realizada utilizando a metodologia de superfície de resposta. Foi utilizado o planejamento experimental composto central. As variáveis independentes foram tamanho de partícula (TP) e concentração da infusão (CI). A variável dependente foi a concentração inibitória mínima (CIM). Desta forma, para cada cepa de fungo foram realizados 10 ensaios, de forma aleatória, com 4 pontos fatoriais ( $2^2$ ), 4 pontos axiais e 2 pontos centrais como apresentado na tabela 2.

Para o tratamento dos dados estatísticos foi utilizado o software *Statistic 7.0*. Foi realizada análise variância com 95% de nível de confiabilidade, análise de regressão e análise dos efeitos com superfície de resposta. Para adequação ao planejamento estatístico de composto central, o tamanho granulométrico P1 foi agregado ao tamanho granulométrico P2, por serem os tamanhos mais próximos.

**Tabela 2:** Níveis e variáveis do planejamento composto central para cada microrganismo.

	Variáveis Independentes			
		TP		CI
<b>1</b>	-1	200	-1	2,5
<b>2</b>	1	80	-1	2,5
<b>3</b>	-1	200	1	10,0
<b>4</b>	1	80	1	10,0
<b>5</b>	2	45	0	5,0
<b>6</b>	-2	400	0	5,0
<b>7</b>	0	100	2	20,0
<b>8</b>	0	100	-2	1,25
<b>9</b>	0	100	0	5,0
<b>10</b>	0	100	0	5,0

TP= tamanho de partícula (Mesh); CI= concentração da infusão (g.100mL<sup>-1</sup>).

## 2.5 Infusão

Foi realizada uma infusão com as partículas, baseando-se no método utilizado por Carabajal *et al.* (2017) e Brandão *et al.* (2016). Foram produzidos chás nas seguintes concentrações: 1,25 g.100mL<sup>-1</sup>, 2,5 g.100mL<sup>-1</sup>, 5 g.100mL<sup>-1</sup>, 10 g.100mL<sup>-1</sup>, 20 g.100mL<sup>-1</sup>. A água destilada e esterilizada foi aquecida até o ponto de ebulição, em seguida foi posta em contato com a matéria prima vegetal e esta mistura foi mantida em temperatura ambiente por 10 min, em seguida foi filtrada com papel filtro qualitativo. Esta infusão (chá) foi mantida em refrigeração (2 a 8 °C) até utilização nas análises microbiológicas.

## 2.6 Análise antimicrobiana in vitro

Foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) dos microrganismos *Candida albicans* (11006 e 90028), *Candida glabrata* (10221), *Candida tropicalis* (750) e *Candida krusei* (34135) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A suspensão de cada microrganismo foi obtida transferindo as culturas crescidas sobre o meio de cultura Agar Sabouraud, com alça estéril, para um tubo de ensaio contendo solução salina 0,9% estéril. O inóculo microbiano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm, onde as referidas suspensões foram diluídas de modo a

obter-se uma preparação microbiana com concentração final próxima a  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas estéreis como descrito pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (2012), com adaptações. Para as cepas de *Candida spp.* foi utilizado caldo sabouraud dextrose. O crescimento microbiano foi indicado pela visualização de turvação característica de fungos após incubação de 2 h a temperatura adequada para os microrganismos de 25 °C ( $\pm 1$  °C). As análises foram realizadas em triplicata (PALOMINO *et al.*, 2002; SARKER *et al.*, 2007).

## **2.7 Atividade hemolítica in vitro**

As diferentes granulometrias foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade. Foi preparada uma suspensão de hemácias 4% em solução salina 0,9%. Em seguida, 100  $\mu$ L desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 100  $\mu$ L das partículas em forma de chá preparados como descrito na seção 2.2. A leitura foi realizada por espectrofotometria (540 nm) utilizando o equipamento ELISA. Como fins de cálculo foram utilizadas a solução salina 0,9% e as infusões para confirmar os resultados da leitura espectral. Foi utilizado como controle negativo a suspensão de hemácias 4% e controle positivo uma solução de ácido acético a 2% (Líquido de Turk). O teste procurou evidenciar o grau de hemólise e a concentração efetiva 50 % (EC50) (LUIZE *et al.*, 2005).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Granulometria dos pós

A pulverização utilizando moinho de facas resultou em quantidades de tamanhos granulométricos como apresentado na tabela 3. O tamanho P2 destaca-se por apresentar o maior massa, portanto existe a predominância de grânulos entre 0,420 e 0,706 mm.

A uniformidade do tamanho de partícula é um parâmetro muito discutido e avaliado na indústria farmacêutica, pois interfere em diversas etapas do processamento de produtos, além da qualidade do produto acabado. Isto é observado no trabalho de McCormac *et al.* (2017), onde foi avaliado formas de uniformizar o tamanho de partícula de minerais utilizando principalmente flotação, com finalidade de otimizar diversos processos industriais.

**Tabela 3:** Rendimento da granulometria do pós das folhas de *S. brasiliensis*.

Tamanhos	n1 (g)	n2 (g)	n3 (g)	Rendimento (%)
P1	8,26	11,62	11,15	10,34 ( $\pm 1,82$ )
P2	60,34	59,94	58,90	59,72 ( $\pm 0,74$ )
P3	25,02	24,47	23,24	24,24 ( $\pm 0,91$ )
P4	2,08	0,93	1,64	1,55 ( $\pm 0,58$ )
P5	2,81	1,41	3,19	2,47 ( $\pm 0,94$ )
P6	0,42	0,00	0,30	0,36 ( $\pm 0,22$ )
Perda	1,07	1,63	1,58	1,42 ( $\pm 0,31$ )

n = quantidade de replicatas realizadas.

O trabalho desenvolvido por Razavi *et al.* (2018) avaliou a uniformização do tamanho de partícula na otimização do deslizamento, resistência a tração e rigidez de comprimidos. Obteve como resposta um modelo para compressão de pós que são submetidos a diferentes condições de deformação, além de observar que a uniformização das partículas colabora com a estabilidade do modelo.

O rendimento torna-se um dos fatores preponderantes na indústria farmacêutica, principalmente no desenvolvimento de fitoterápicos. É um dos principais fatores no processo de otimização de métodos analíticos (ZHANG, ZHAO; 2017). Em relação ao rendimento das frações granulométricas, observa-se que a quantidade de matéria prima obtida diminui para as menores partículas, após o processo de pulverização por moinho de facas.

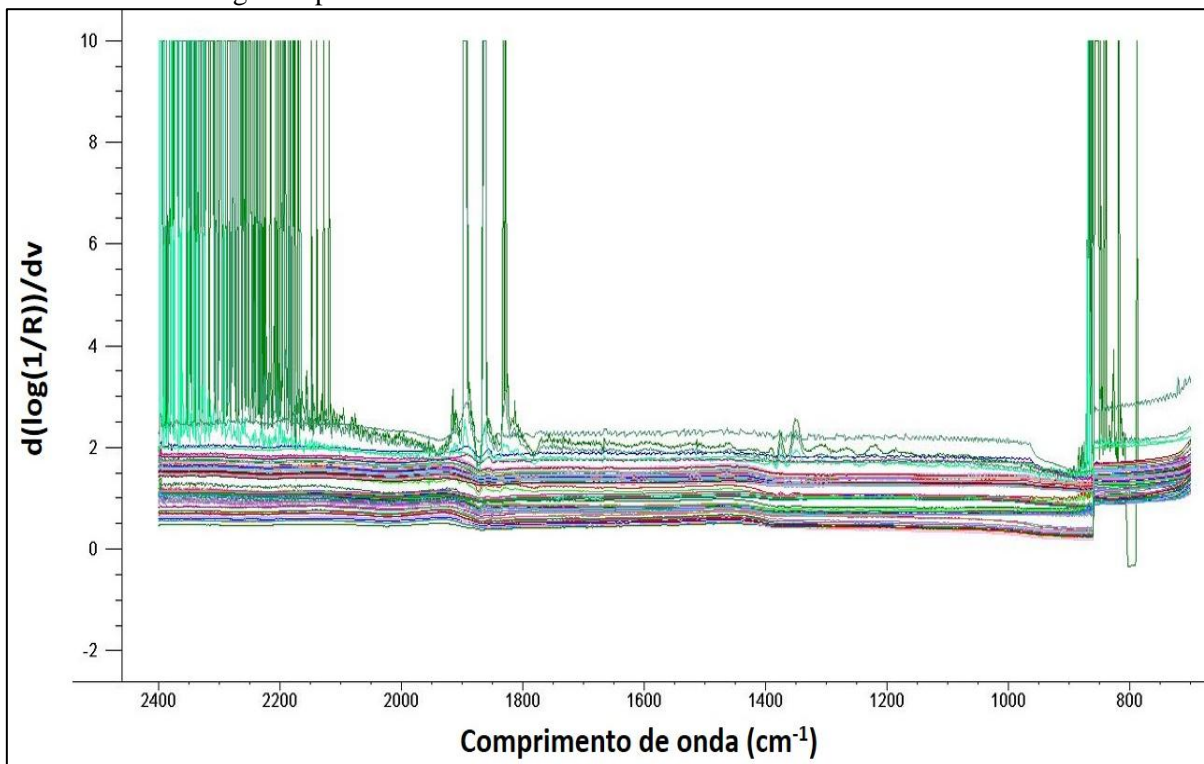


### 3.4 Estudo quimiométrico

Os espectros brutos obtidos para os diferentes tamanhos granulométricos estão mostrados na figura 1. Nestes espectros foram utilizadas as ferramentas de pré-processamento para melhor visualização e reconhecimento de padrões. Na figura 1 são demonstrados todos espectros de 5 tamanhos granulométricos mostrados na tabela 1 e os espectros do pó pulverizado sem a separação por tamanhos.

Observa-se uma região de intenso ruído em algumas amostras que podem ser atribuídas a inconstâncias elétricas do instrumento, além de mudança de linha de base no intervalo entre 800 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Estas informações não foram consideradas como parte da amostra. Para esta análise, a tamanho P6 não teve rendimento na granulometria dos pós suficiente para execução da análise, dessa forma, este tamanho granulométrico foi analisado em mistura com o tamanho P5.

**Figura 1:** Espectros brutos de variações granulométricas de matéria prima vegetal a partir de folhas de *S. brasiliensis* na região espectral de 2400 a 700 $\text{cm}^{-1}$ .

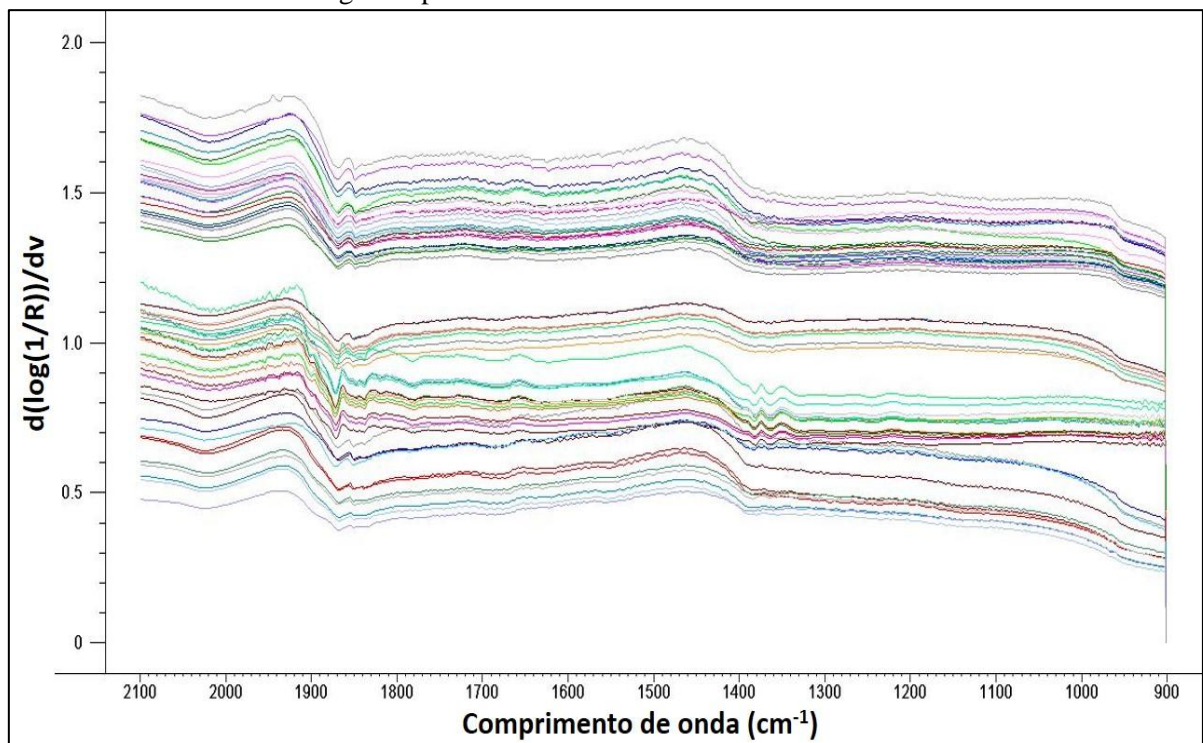


Foram utilizados como pré-processamento a suavização por polinômio móvel (Savitzky–Golay). Foi realizada uma eliminação de dados anômalos (*outliers*) sem ponderação de variáveis e amostras, de modo a ressaltar características espectrais de cada

amostra. Foi excluído 1 espectro do tamanho granulométrico P1, além de 2 espectros do tamanho P2 e 2 espectros do tamanho P5. As variáveis eliminadas foram selecionadas de 2400 a 2100  $\text{cm}^{-1}$  e de 900 a 700  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados pré-processados podem ser observados na figura 2.

Estes espectros foram submetidos as técnicas não supervisionadas de reconhecimento de padrão, a HCA e a PCA, ou seja, uma análise de triagem para avaliar o comportamento e as características de similaridades e dissimilaridades das amostras. Em segundo momento foi realizado uma análise supervisionada, a SIMCA, de modo a estabelecer um modelo de comportamento das amostras.

**Figura 2:** Espectros pré-processados de variações granulométricas da matéria prima vegetal a partir de folhas de *S. brasiliensis* na região espectral de 2100 a 900 $\text{cm}^{-1}$ .



#### 3.4.1 Análise de componentes hierárquicos (HCA)

A figura 3 mostra o dendograma do estudo com o pó das folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos, tratados utilizando a técnica de HCA. Foram testadas as tipos de ligações *single linkage*, *complete linkage* e *ward's method*. Além disso, as distancias entre os grupamentos foram euclidiana, *city-block manhattan*, *chebychev* e *1-pearson r*. Os tipos de ligações foram testados em combinação com as distâncias citadas, sendo verificado que a *complete linkage* com distância euclidiana apresentou melhor visualização de agrupamentos.

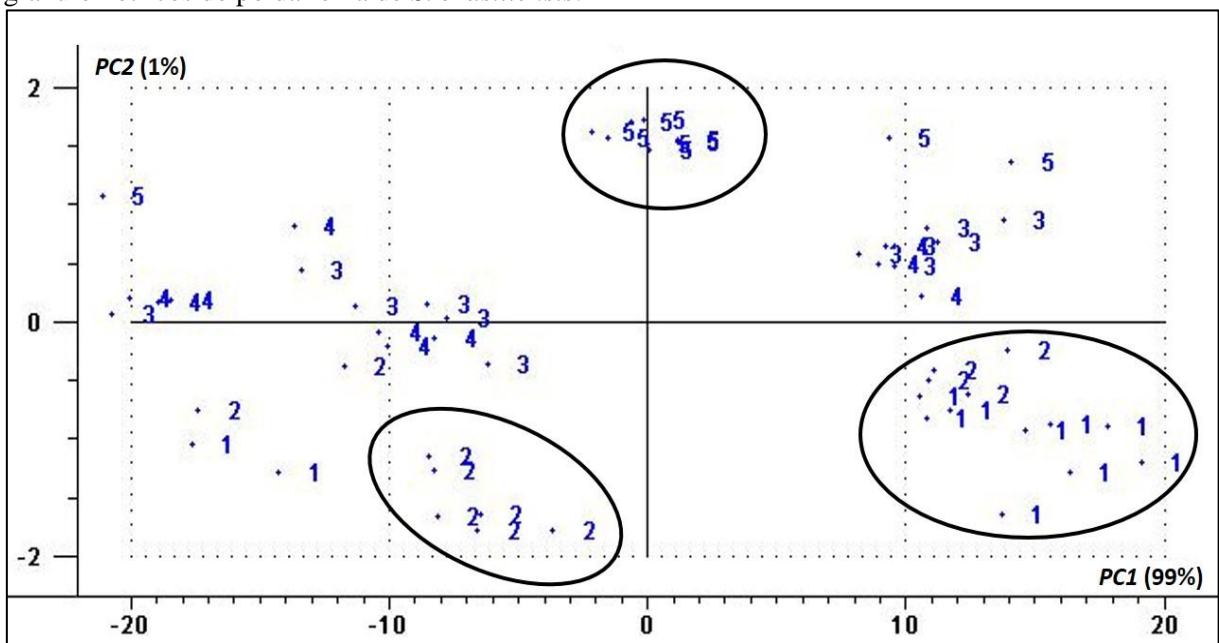


menor. Na figura 4 observa-se a plotagem das amostras e aproximação de acordo com a similaridade de forma a criar agrupamentos entre as amostras.

De maneira semelhante aos resultados observados quando utilizado a técnica de HCA, foram observados aproximação entre as partículas P1, P2 e P5. Em relação as P3 e P4, observa-se um espalhamento pelo centro da plotagem, indicando características semelhantes e intermediárias em relação as granulometrias menores e maiores. Estas informações de proximidade entre as amostras foram consideradas na realização da SIMCA.

As ferramentas quimiométricas podem ser utilizadas no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, como sugerido no trabalho desenvolvido por Hidalgo *et al.* (2018) que aplicou técnicas de classificação associado do uso de impressão digital multidimensional e elementar para avaliação de azeitonas com aplicação no controle de qualidade.

**Figura 4:** Plotagem de pontos da PC1(99%) X PC2(1%) para as amostras de cinco tamanhos granulométricos de pó da folha de *S. brasiliensis*.



### 3.4.3 Modelagem flexível independente por analogia de classe

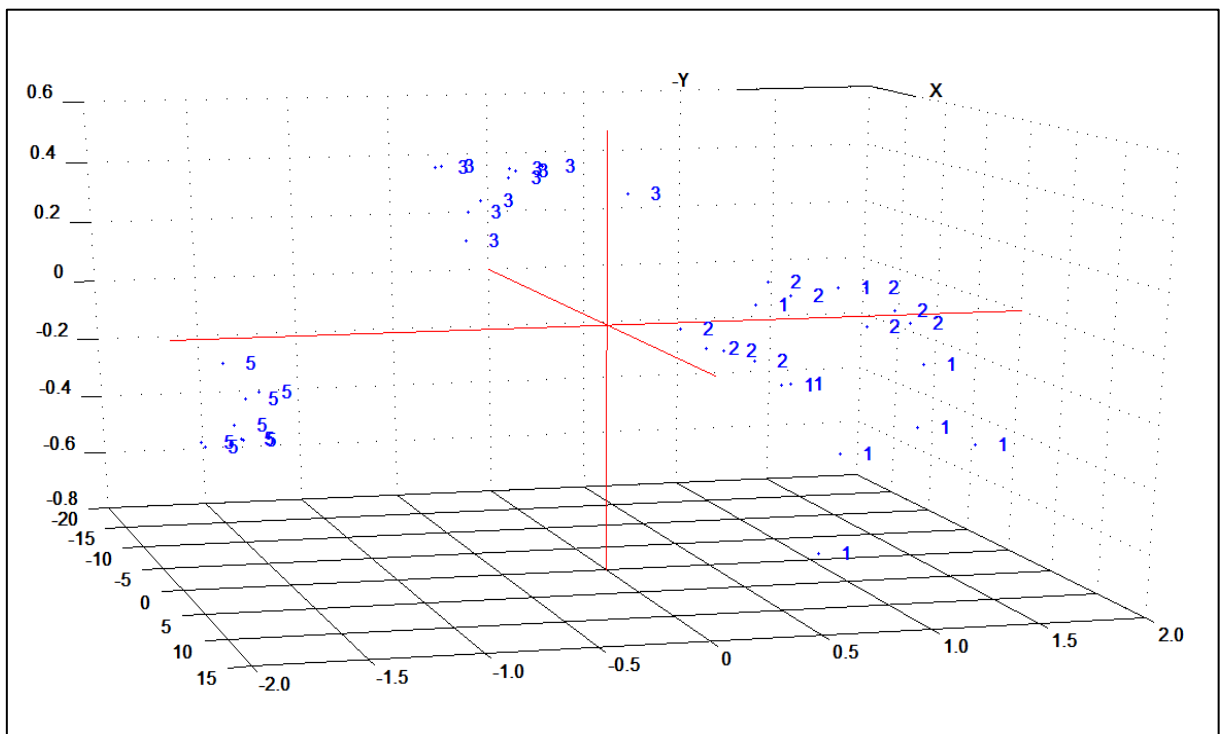
O conjunto de treinamento foi construído utilizando 36 medições. A validação do modelo foi baseado em validação cruzada (*leave-one-out*). O conjunto de classificação foi constituído de 7 a 10 espectros para cada tamanho granulométrico. A modelagem por analogia de classe foi aplicada com 95% de confiança estatística. A observação de características

próximas entre os tamanhos P3 e P4 levou a união destes dois grupos em um agrupamento intermediário. O resultado está demonstrado na figura 5.

Portanto, observa-se a classificação em três grupos: o de tamanho grande (P1 e P2) compreendendo as partículas maiores que 0,420 mm; o tamanho médio (P3 e P4) que corresponde as partículas com tamanho entre 0,149 e 0,419 mm; e o tamanho pequeno (P5 e P6) que indica as partículas menores que 0,148 mm.

O infravermelho próximo é uma região do espectro de luz que possibilita identificar vibrações das moléculas, muitas vezes não bem definidas em bandas no espectro, principalmente em se tratando de matéria prima vegetal, por possuir complexa composição química. O NIR tem como características a facilidade de análise, curto tempo de duração, ser um técnica não destrutiva e com moderado custo para a indústria, sendo também utilizada para compostos de origem vegetal, como óleos e chás (SANDASI *et al.*, 2018).

**Figura 5:** Scores para modelagem com conjunto de classificação com tamanhos granulométricos do pó das folhas de *S. brasiliensis*.



Os resultados obtidos confirmam que o SIMCA é uma técnica quimiométrica robusta para classificação de amostras sólidas de origem vegetal quando aplicada em espectro de infravermelho próximo. Conclusões semelhantes foram obtidas no trabalho desenvolvido por Guarmarudi *et al.* (2019).

### 3.2 Atividade antimicrobiana

As infusões produzidas com as folhas de *S. brasiliensis* possuem ação antifúngica frente as cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. A concentração efetiva variou de 39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 1,25  $\text{mg.mL}^{-1}$ , como observado na tabela 4.

**Tabela 4:** Concentração inibitória mínima (CIM) da *S. brasiliensis* frente cepas fúngicas.

Ensaio	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	Ca1	Ca2	Ct	Ck	Cg
<b>1</b>	78	39	156	156	156
<b>2</b>	312	78	312	625	625
<b>3</b>	78	312	650	625	156
<b>4</b>	156	625	1250	1250	625
<b>5</b>	312	312	78	1250	625
<b>6</b>	39	78	312	156	78
<b>7</b>	156	1250	312	625	1250
<b>8</b>	39	39	312	312	312
<b>9</b>	78	156	156	625	312
<b>10</b>	78	156	156	625	312

Ca1= *C. albicans* (11006); Ca2= *C. albicans* (90028); Cg= *C. glabrata*,  
Ct= *C. tropicalis*; Ck= *C. krusei*.

#### 3.2.1 Análise de variância

Analisando a influência do tamanho de granulometria e a concentração da infusão em relação a CIM de cada amostra frente a cepa de *C. albicans* (ATCC 11006) observa-se que apenas o tamanho de granulometria linear é significativo, com 95% de nível de confiança. Isto pode ser evidenciado na tabela 5.

**Tabela 5:** Análise de variância para *C. albicans* (11006).

Fatores	Soma dos quadrados	Df	Média quadrática	F- valor	p - valor
<b>TP (L)</b>	61347,00	1	61347,00	13,42380	0,021507*
<b>TP (Q)</b>	7467,43	1	7467,43	1,63400	0,270285
<b>CI (L)</b>	507,00	1	507,00	0,11094	0,755802
<b>CI (Q)</b>	48,76	1	48,76	0,01067	0,922700
<b>TP por CI</b>	6084,00	1	6084,00	1,33129	0,312824
<b>Erro</b>	18280,07	4	4570,02		
<b>Total SS</b>	95246,10	9			

R<sup>2</sup>= 0,8081. \* Estatisticamente significativo para p< 0,05.

Quando analisados os mesmos parâmetros frente a cepa de *C. albicans* (ATCC 90028), observa-se que o tamanho de granulometria de forma linear e quadrática são significativos em relação a CIM, como observado na tabela 6.

**Tabela 6:** Análise de variância para *C. albicans* (90028).

<b>Fatores</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Df</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F- valor</b>	<b>p - valor</b>
<b>TP (L)</b>	10620127	1	10620127	16,51285	0,015303*
<b>TP (Q)</b>	6129722	1	6129722	9,53088	0,036674*
<b>CI (L)</b>	67650	1	67650	0,10519	0,761944
<b>CI (Q)</b>	51670	1	51670	0,08034	0,790903
<b>TP por CI</b>	202050	1	202050	0,31416	0,605046
<b>Erro</b>	2572573	4	643143		
<b>Total SS</b>	20803761	9			

R<sup>2</sup>= 0,8763. \* Estatisticamente significativo para p< 0,05.

Assim, quando analisamos estas variáveis independentes frente as cepas de *C. tropicalis* e *C. krusei* verifica-se que a concentração da infusão foi significativa e o tamanho de granulometria não. Isto pode ser observado nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7:** Análise de variância para *C. tropicalis* (750).

<b>Fatores</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Df</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F- valor</b>	<b>p - valor</b>
<b>TP (L)</b>	77120,3	1	77120,3	4,92271	0,090742
<b>TP (Q)</b>	411,9	1	411,9	0,02629	0,879056
<b>CI (L)</b>	20336,3	1	20336,3	1,29810	0,318158
<b>CI (Q)</b>	233911,1	1	233911,1	14,93090	0,018085*
<b>TP por CI</b>	8281,0	1	8281,0	0,52859	0,507469
<b>Erro</b>	62665,0	4	15666,2		
<b>Total SS</b>	461136,9	9			

R<sup>2</sup>= 0,8441. \* Estatisticamente significativo para p< 0,05.

No entanto, frente a *C. tropicalis* foi observada significância na concentração da infusão linear e para a *C. krusei* foi significativa a concentração da infusão quadrática.

**Tabela 8:** Análise de variância para *C. krusei* (34135).

<b>Fatores</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Df</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F- valor</b>	<b>p - valor</b>
<b>TP (L)</b>	897627	1	897627	1,33068	0,312920
<b>TP (Q)</b>	38258	1	38258	0,05671	0,823468
<b>CI (L)</b>	9135075	1	9135075	13,54221	0,021204*
<b>CI (Q)</b>	4771751	1	4771751	7,07384	0,056410
<b>TP por CI</b>	2809	1	2809	0,00416	0,951644
<b>Erro</b>	2698252	4	674563		
<b>Total SS</b>	18459755	9			

R<sup>2</sup>= 0,8538. \* Estatisticamente significativo para p< 0,05.

Em relação a atividade antimicrobiana frente a cepa de *C. glabrata* observa-se novamente que o tamanho de granulometria foi significativo também de forma linear, como é observado na tabela 9.

**Tabela 9:** Análise de variância para *C. glabrata* (10221).

Fatores	Soma dos quadrados	Df	Média quadrática	F- valor	p - valor
TP (L)	343408,3	1	343408,3	31,60057	0,004924*
TP (Q)	1047,8	1	1047,8	0,09641	0,771682
CI (L)	32865,3	1	32865,3	3,02428	0,157013
CI (Q)	22957,1	1	22957,1	2,11252	0,219764
TP por CI	1,0	1	1,0	0,00009	0,992806
Erro	43468,6	4	10867,2		
<b>Total SS</b>	<b>444844,4</b>	<b>9</b>			

R<sup>2</sup>= 0,9023. \* Estatisticamente significativo para p< 0,05.

As ações antimicrobianas e antifúngicas desta espécie foram também evidenciadas pelos trabalhos de Chaves *et al.* (2015), Silva *et al.* (2015) e Jovito (2016), que avaliaram suas ações frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae*, além de fungos como *Candida albicans*, *Candida Krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*. A forma de extração considerada foram extrações hidroalcolicas como ponto de partida. No entanto, outras variáveis podem influenciar na ação frente a microrganismos.

Portanto, as variáveis tamanho granulométrico e concentração da infusão apresentaram significância na atividade antimicrobiana das folhas de *S. brasiliensis*, evidenciando que alterações no tamanho granulométrico pode alterar significativamente a ação desta espécie vegetal frente cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, além da concentração da infusão se sensível em relação a ação antimicrobiana frente *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Observa-se ainda em que para alguns microrganismos a concentração da infusão não é significativa, evidenciando que a maior concentração de 20 g.100mL<sup>-1</sup> de infusão não teve grande variação na CIM em relação a concentração de 1,25 g.100mL<sup>-1</sup>. Estes resultados podem ser relacionados com estudos de potência farmacológica, pois correlaciona as duas concentrações e demonstra que as duas concentrações são eficazes, mas a menor concentração apresenta maior potência, menor gastos de matéria prima e menos probabilidade de ocasionar efeitos tóxicos (BRANDÃO *et al.*, 2014; FOKOU *et al.*, 2016).



### 2.2.2 Análise de regressão

O uso das ferramentas estatísticas atua diretamente na facilitação ou otimização do processo de escolha de melhores parâmetros de tamanho de partícula e concentração da infusão para obtenção da CIM adequada. Os valores preditos podem ser alcançados utilizando as equações de regressão como seguem abaixo 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente *C. albicans* (11006), *C. albicans* (90028), *C. tropicallis*, *C. krusei*, *C. glabrata*.

$$CIM = 104,78 + 71,5TP \quad (1)$$

$$CIM = -9,42 + 940,75TP + 607,8TP^2 \quad (2)$$

$$CIM = 194,64 + 118,73CI^2 \quad (3)$$

$$CIM = 371,36 + 872,5CI \quad (4)$$

$$CIM = 328,42 + 169,17TP \quad (5)$$

Os valores encontrados para as variáveis determinadas para tamanho de granulometria e concentração da infusão podem ser observados na tabela 4, onde são verificados os valores mesurados experimentalmente.

### 2.2.3 Análise dos efeitos

O efeito ocasionado pela variação do TP e pela variação da CI estão demonstrados nos gráficos de superfície de resposta (Figura 6). Seguem abaixo as respectivas análises da ação da *S. brasiliensis* frente as cinco cepas de fungos leveduriformes.

Na tabela 4 observa-se os valores de CIM das infusões, incluindo concentrações menores que 1 mg.mL<sup>-1</sup> para diferentes fungos. De acordo com Rios; Recio (2005), a concentração efetiva de um extrato vegetal deve ser menor que 1 mg.mL<sup>-1</sup>, para que esse extrato seja melhor utilizado como fitoterápico. Concentrações tão baixas podem não ser efetivas, desta forma são recomendadas otimizações em relação a extração de metabólitos.

Em relação a uma otimização da CIM, é importante perceber que as grandezas são inversamente proporcionais, pois uma potência elevada na atividade antimicrobiana acontece

quando obtemos uma CIM baixa. Quanto mais baixa a CIM mais provável de obter um produto com atividade antimicrobiana suficiente para continuidade de estudos de desenvolvimento de fitoterápicos.

Para a *C. albicans* (11006), a CIM diminui a medida que a CI também diminui, em relação ao TP a diminuição do tamanho granulométrico favorece a obtenção de CIM menores de forma mais acentuada, portanto a CIM efetiva das folhas de *S. brasiliensis* frente a este microrganismo ocorre com a diminuição da concentração da infusão e do tamanho granulométrico. Já para a *C. albicans* (90028), as CIs apresentaram baixa CIM e os TP obtiveram baixa CIM à medida que diminuía o tamanho das partículas. Desta forma o tamanho de partícula reduzido favorece a atividade antimicrobiana frente a esta cepa.

Em relação a *C. tropicallis*, *C. krusei* o tamanho granulométrico não foi significativo em relação a CIM, mas a menor CIM é obtida com concentrações de infusão intermediárias. Para a *C. glabrata* observa-se que a CI e o TP diminuem e conseqüentemente apresentam CIM menores, sendo a TP com maior inclinação.

A otimização da CIM decorrente da diminuição do tamanho de partícula pode estar relacionada com o aumento da superfície de contato, possibilitando uma maior extração de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antifúngica, como observado no trabalho de Santos *et al.* (2018). Em relação a concentração da infusão a saturação do solvente pode influenciar também na extração de metabólitos, pois na infusão não existe troca de solvente e não variação de concentração entre o líquido extrato (água) e o interior da célula vegetal pode acarretar em estabilização da extração destes metabólitos (SIMÕES, 2004).

A capacidade dos microrganismos de reagirem de forma idiossincrática em relação aos inúmeros agentes antimicrobianos também é pertinente em relação a atividade antifúngica da *S. brasiliensis*. O trabalho desenvolvido por Tripathi *et al.* (2012) aponta para diversificação de comportamento de cepas clínicas do gênero *Candida* spp. em relação aos diversos agentes antifúngicos como polimixina B e flucitosina, além de observar a ocorrência de resistência aos antifúngicos, causada pela adaptação das cepas. Portanto, os microrganismos podem reagir de formas diferentes frente aos diversos agentes antimicrobianos.

Em relação a *S. brasiliensis*, o trabalho realizado por Jovito (2016) aponta que a atividade antifúngica desta espécie decorre da ação conjunta dos diversos metabólitos secundários presentes nas folhas. A composição das folhas está relacionada a compostos fenólicos como polifenóis, taninos e flavonoides.

### 3.3 Atividade de citotoxicidade em hemácias

Todas as amostras testadas, independentemente do tamanho granulométrico, apresentaram baixa citotoxicidade em hemácias, como pode ser observado na tabela 10. Nenhuma partícula em forma de chá apresentou taxa de hemólise igual ou superior a 50%, para definição de IC50, que determina a concentração necessária para hemolisar 50% da suspensão a 4% de hemácias. Este é um parâmetro bastante comum em ensaios de toxicidade. (YAMAGUCHI *et al.* 2013).

**Tabela 10:** Taxa de hemólise da infusão de *S. brasiliensis* frente a hemácias.

<b>Tamanho Granulométrico</b>	<b>Taxa de Hemólise (%)</b>
P1	2,01
P2	5,28
P3	0,00
P4	0,00
P5	1,44
P6	0,46

A citotoxicidade apresentada serve como um parâmetro para avaliar a agressão causada pelo chá em umas das células mais sensíveis de um usuário desta espécie vegetal. A citotoxicidade pode ser definida como a propriedade nociva de uma substância a uma célula, portanto este teste *in vitro* avalia a relação dos constituintes dos chá com os componentes da membrana celular (Martins *et al.* 2009).

Na caracterização e pesquisa de novas formas com potencial terapêutico, principalmente de origem vegetal, a toxicidade torna-se importante pela necessidade de garantir segurança ao uso, no entanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que estudos de toxicidade aguda *in vivo* e também de forma crônica sejam realizadas, nesta perspectiva a citotoxicidade auxilia no direcionamento destes estudos, além de ser informação preliminar de ausência de toxicidade.

#### 4 CONCLUSÃO

A classificação utilizando técnicas quimiométricas evidenciou que estas ferramentas possuem aplicabilidade na caracterização de matéria-prima vegetal. O HCA apresentou separação das amostras quando utilizado o tipo de ligação *complete linkage* e a distância euclidiana. As ferramentas PCA e SIMCA apresentaram-se positivas na classificação de matéria prima vegetal obtida a partir das folhas de *S. brasiliensis*, proporcionando a observação de amostras de tamanhos granulométricos pequenos, médios e grandes no plano quando aplicadas em espectros de infravermelho próximo. Portanto, estas técnicas de rápida excussão, não destrutiva e que necessita de pequena quantidade de amostras podem ser utilizadas na caracterização de matéria-prima vegetal, além de indicar sua aplicabilidade no controle de qualidade de fitoterápicos. A droga vegetal a partir da *Schinopsis brasiliensis* possui valiosa atividade antifúngica frente a cepas do gênero *Candida* ssp. A uniformização da partícula em tamanhos granulométricos avaliada de forma conjunta com infusões em diferentes concentrações mostram um perfil antifúngico inclinado a diminuição do tamanho granulométrico e com concentrações de infusão próximas a 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Tanto o TP quando a CI apresentaram-se significativas no efeito antifúngico de infusões das folhas da *S. brasiliensis*. A avaliação da taxa de hemólise apresentou baixo grau em relação ao padrão utilizado, indicando ausência de toxicidade aguda, no entanto estudos mais detalhados devem ser realizados para comprovação.

## REFERÊNCIAS

- BRANDÃO, D. O.; GUIMARÃES, G. P.; SANTOS, R. L.; RAMOS-JÚNIOR, F. J. L.; SILVA, K. M. A.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. e7528297, 2016.
- CHAVES, T. P.; DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; VIEIRA, K. V. M.; CLEMENTINO E. L. C.; COSTA, L. S. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 11-17, 2011.
- CHAVES, T. P. Evaluation of the potencial modulador of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 33, p. 834-849, 2015.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo**, v. 25 n. 1, 2012.
- FOKOU, P. V. T.; OPONG, R. A.; MANU, D. Y.; TWUN, A. A. K.; YAMTHE, L. R. T.; KOGNOU, A. L. M.; ADDO, P.; BOYOM, F. F.; NYARKO, A. K. Antimicobacterial potency and cytotoxicity study of three medicinal plants. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 1, p. 206-207, 2016.
- DASTJERDI, A. G.; AKHGARI, M.; KAMALI, A.; MOUSAVI, Z. Principal component analysis of synthetic adulterants in herbal supplements advertised as weight loss drugs. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 31, n.1, p. 236-241, 2018.
- GAMARUDI, A. B.; KHANMOHAMMADI, M.; FARD, H. G.; GUARDIA, M. Origin based classification of crude oils by infrared spectrometry and chemometrics. **Fuel**, v. 236, n.1, p. 1093-1099, 2019.
- HIDALGO, M. J.; POZZI, M. T.; FURLONG, O. J.; MARCHEVSKY, E. J.; POLLERANO, R. G. Classification of organic olives based on chemometric analysis of elemental data. **Microchemical Journal**, v. 142, n. 1, p. 30-35, 2018.
- JOVITO, V. C. **Atividade anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl.** 2016. 47f. Dissertação (Mestrado em odontologia) –Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromathography B**, v. 812, n. 1, p. 53-70, 2004.
- MA, M. N.; UM, T. H.; Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v. 194, n. 1, p. 237-246, 2016.
- MARTINS, M. D.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; FERRARI, A. M. FERNANDES, K. P. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **Consientiae Saúde**, v.8, n.1, p.99-104, 2009.
- MCCORMAC, A. N.; PARADA, P. R. B.; HADLER, K., COLE, K., CILLIERS, J. J. The effect of particle size distribution on froth stability in flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 184, n. 1, p. 240-247, 2017.

PALOMINO, J. C. MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

RAZAVI, S. M.; GONZALEZ, M.; CUITINO, A. M. Quantification of lubrication and particle size distribution effects on tensile strength and stillness of tablets. **Powder Technology**, v. 336, n. 1, p. 360-374, 2018.

RÍOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 80-84, 2005.

SANDASI, M.; CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. Non-destructive quality assessment of herbal tea blends using hyperspectral imaging. **Phytochemistry Letters**, v. 24, n. 1, p. 94-101, 2018.

SANTOS, C. C. S.; MASULLO, M.; CERULLI, A.; MARI, A. *et al.* Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, v. 140, n. 1, p. 45- 51, 2017.

SANTOS, C. C. S.; GUILHON, C. C.; MORENO, D. S. A.; ALVIANO, C. S.; ESTEVAM, C. S.; BRANK, A. F.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidante properties of *Schinopsis brasiliensis* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 213, n. 1, p. 176-182, 2018.

SAKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SILVA, K. M. A.; CHAVES, T. P.; SANTOS, R. L.; BRANDÃO, D. O.; FERNANDES, F. H. A.; SANTOS, V. L.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 2, p. 92- 98, 2015.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/ Florianópolis: editora UFRS/UFSC, 2004.

SRIVASTAVA, A. K. **Significance of medicinal plants in human life**. CBGM laboratory, Augusta University, Augusta, GA, USA. P. 1-24, 2018.

TRIPATHI, B. S. N.; WATT, M. D. K.; BENJAMIN, D. K. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis. **Seminars in Perinatology**, v. 36, n. 1, p. 416-423, 2012.

VERAS, G.; GOMES, A. A.; SILVA, A. C. BRITO, A. L. B.; ALMEIDA, P. B. A., MEDEIROS, E. P. Classification of biodiesel using NIR spectrometry and multivariate techniques. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 565-568, 2010

YAMAGUCHI, K. K. L. *et al.* Atividades biológicas dos óleos essenciais de *endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v.36, n.6, p.826-830, 2013.

ZHANG, L. P.; ZHAO, Y. Y. Particle size distribution of tin powder produced by centrifugal atomization using rotation cups. **Powder Technology**, v. 318, n. 1, p. 62-67, 2017.

# CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E TERMOANALÍTICA DA  
DROGA VEGETAL DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER EM  
DIFERENTES TAMANHOS GRANULOMÉTRICOS**

## **Caracterização Fitoquímica, Morfológica e Termoanalítica da Matéria Prima Vegetal das folhas de *Schinopsis Brasiliensis* Engler em Diferentes Tamanhos Granulométricos**

Jocimar da Silva Santos, Jéssica de Andrade Cabral, Ana Claudia Dantas de Medeiros

### **RESUMO**

A *Schinopsis brasiliensis* é uma espécie vegetal bastante presente nos biomas Caatinga e Cerrado, sendo suas folhas amplamente utilizadas na medicina popular como antifúngica e anti-inflamatória. Diversos estudos científicos comprovam suas ações biológicas e inúmeros métodos analíticos têm sido utilizados para auxiliar na caracterização de compostos derivados de matéria-prima vegetal. Desta forma o objetivo deste trabalho é utilizar técnicas morfológicas, de prospecção química e termoanalíticas para caracterizar a matéria prima vegetal da *S. brasiliensis* em diferentes granulometrias. A amostra do vegetal foi coletada na região semiárida da Paraíba, Brasil. O material foi desidratado e pulverizado com posterior separação em seis tamanhos granulométricos. Foram utilizadas as técnicas de microscopia óptica como ferramenta de análise morfológica, a espectroscopia na região de ultravioleta e visível como ferramenta de quantificação de metabólitos secundários, além da cromatografia líquida de alta eficiência como método qualitativo de avaliação de marcador químico. Para análise termoanalítica foram utilizadas as técnicas de termogravimetria e análise térmica diferencial. Como resultado, foram observadas formas amorfas e uniformes das diferentes granulometrias. O teor de polifenóis totais, flavonóides e taninos foram obtidos, direcionando a identificação do ácido gálico como marcador químico. As metodologias termoanalíticas possibilitaram a caracterização físico-química das granulometrias. Portanto, a caracterização granulométrica e uniformização de granulometria torna-se parâmetros essenciais na padronização de matéria prima vegetal candidata a estudos de desenvolvimento de fitoterápicos.

**Palavras-chave:** Uniformidade de partícula. Matéria prima vegetal. Granulometria.



## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do uso de plantas medicinais é de grande importância no desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, pois as plantas apresentam fácil acesso, ampla aplicabilidade farmacológica, complexa composição química e muitas vezes baixo custo. O mercado de produtos fitoterápicos está crescendo em todo o mundo, mas esta expansão necessita de avanços tecnológicos em relação ao controle de qualidade, provas de segurança e provas de eficácia destes medicamentos (FALZON, BALABANOVA, 2017).

A espécie *Schinopsis brasiliensis* é utilizada pela medicina popular em diversas regiões do Brasil, de forma desidratada e pulverizada em pequenas porções. As folhas da *S. brasiliensis* é um exemplo de parte vegetal utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções fúngicas como a Candidíase, no entanto a forma de partição da droga vegetal está intimamente envolvida com os processos e extração de metabólitos secundários, isto implica em alteração em propriedades biológicas, bem como características físico-químicas (LOPEZ, VILLALBA, 2016). A autenticidade e a garantia da qualidade da matéria prima vegetal é o primeiro passo para a elaboração de produtos com segurança e eficácia (SERESHTI *et al.*, 2018).

O controle da granulometria dos pós de drogas vegetais é um fator importante no processo de fabricação de fitoterápicos, além disso, órgãos de fiscalização nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) informa a importância de avaliar o grau de redução de partículas no caso de formas farmacêuticas tradicionais e de medicamentos fitoterápicos utilizados como produto final pelo consumidor. Desta forma, diversos métodos analíticos têm sido utilizados para auxiliar na caracterização de compostos derivados de drogas vegetais (MA, MU, 2016).

Nesse sentido, técnicas de prospecção química, bem como técnicas termoanalíticas, como a termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) são utilizados para diferentes fins na tecnologia farmacêutica e são de fundamental importância na caracterização e comportamento térmico de drogas como as obtidas a partir de planta (BRANDÃO *et al.*, 2016). Portanto, o objetivo deste estudo é observar a influência que o tamanho granulométrico possui sobre técnicas analíticas utilizadas no controle de qualidade de matéria prima vegetal.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Obtenção da matéria prima vegetal**

As folhas da espécie *S. brasiliensis* foram coletadas na região semiárida da Paraíba, Brasil, na cidade de Pocinhos com latitude 07° 04' 36" e longitude 36° 03' 40". Foram seccionadas a partir de organismos adultos e respeitando-se o tempo ideal para coleta. Foram confeccionadas exsiccatas, além de identificadas e depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes, da Universidade Federal da Paraíba sob número EAN-14049, que comprova a autenticidade da planta.

### **2.2 Preparação do pó**

As folhas da planta foram desidratadas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada em 40 °C ( $\pm 1$  °C), permanecendo na estufa até a estabilização da umidade. O material seco foi pulverizado através de um moinho de facas móveis, acoplados a uma peneira de 10 mesh. Em seguida a matéria prima vegetal foi submetido a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros e denominadas de acordo com a tabela 1, do tópico 2.1, do capítulo 1.

### **2.3 Microscopia óptica**

O pó em diferentes granulometrias foi submetido a técnica de microscopia óptica utilizando um microscópio óptico digital de marca Hirox, modelo KH – 770. Foram avaliados parâmetros físicos, como circunferência, raio, diâmetro e área, das partículas do pó, além de obtidas imagens diferenciais dos grânulos. Estas medida foram determinadas pela média de 100 medições para cada tamanho granulométrico.

### **2.4 Análise fitoquímica quantitativa**

A quantificação de metabólitos secundários presentes na droga vegetal foi realizada para as classes descritas abaixo, utilizado o equipamento ELISA para obtenção das absorvâncias na região do ultravioleta e visível. A calibração do método foi realizada da

seguinte forma: para cada classe foram produzidas 10 soluções de concentrações crescentes do padrão estabelecido, em seguida estas soluções foram submetidas ao método de identificação específico. A expressão numérica foi obtida através de regressão linear utilizando o software Excel 2013.

#### 2.4.1 Determinação de polifenóis

O teor de polifenóis totais foi avaliado através do método descrito por Chandra e Mejia (2004). Adicionou-se 1 mL de água destilada em 50 mg de pó para cada tamanho granulométrico juntamente com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 min. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (m/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 min. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 757 nm, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A curva de calibração foi construída utilizando o padrão ácido gálico, disponibilizado pelo fabricante Sigma-Aldrich e o teor foi expresso em  $\text{mg/EAG.g}^{-1}$ .

#### 2.4.2 Determinação de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonóides totais seguiu o método adaptado de Meda *et al.* (2005). Foi utilizado 50 mg de cada tamanho granulométrico e diluído em metanol. A esta mistura foi adicionado o mesmo volume de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  a 2% (m/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 min antes da leitura da absorbância a 415 nm, foi utilizado um branco composto pela solução de  $\text{AlCl}_3$  em metanol. A curva de calibração foi construída utilizando o padrão quercetina, disponibilizado pelo fabricante Sigma-Aldrich e o teor foi expresso em  $\text{mg/EQU.g}^{-1}$ .

#### 2.4.3 Determinação de taninos

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método adaptado de Makkar e Becker (1993), onde 50 mg do pó de cada tamanho granulométrico foi diluído em água e foi acrescentado 3 mL de uma solução de vanilina 4% (m/v), em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em

água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, foi utilizado um branco composto pela solução de vanilina e HCl em água. A curva de calibração foi construída utilizando o padrão catequina, disponibilizado pelo fabricante Sigma-Aldrich e o teor foi expresso em mg/ECA.g<sup>-1</sup>.

## 2.5 Análise cromatográfica

A droga vegetal a partir das folhas da *S. brasiliensis* foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de modo qualitativo. Para isto, foi utilizado o equipamento da Shimadzu LC-10, controlado pelo software Class VP, equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-A<sub>HT</sub>, forno para coluna CTO-20A, detector UV/Vis modelo SPD-20A. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 Gemini – NX 5 $\mu$  (250 x 4,6mm). Para separação do ácido gálico em aproximadamente 7,5 min a fase móvel foi constituída por ácido acético 0.1% e metanol (90:10, v/v), utilizando um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu$ L. O comprimento de onda foi de 254 e 280 nm (FERNANDES *et al.* 2015).

## 2.6 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas do pó da planta em diferentes tamanhos granulométricos utilizando um analisador térmico simultâneo Shimadzu modelo DTG-60. Para a análise foram utilizados cadinhos de alumina, a massa da amostra foi aproximadamente 8mg ( $\pm 0,1$  mg), sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados no intervalo de 30 a 900 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. A calibração do analisador térmico foi realizada com oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas usando o software TASYs WS60, Shimadzu.

## 2.8 Análise térmica diferencial (DTA)

As curvas de DTA foram obtidas em um analisador térmico Shimadzu DTA-60, utilizando cadinhos de alumínio com cerca de 2 mg ( $\pm 0,1$  mg) de amostra, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados no intervalo de

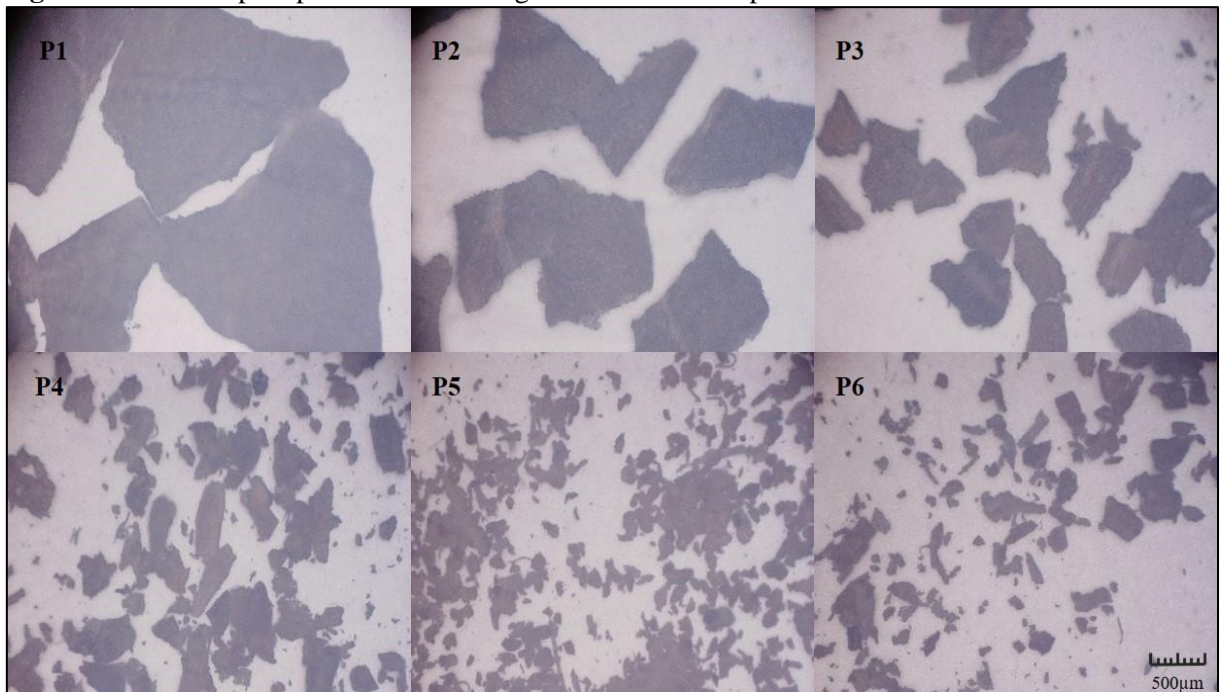
temperatura entre 30 a 450 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados utilizando o software TASYs, Shimadzu.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Microscopia óptica

As diferentes granulometrias foram submetidas a observação microscópica da forma em que os grânulos se apresentam e como estão dispostos. Na figura 1 é possível observar os seis tamanhos no mesmo aumento de 140 vezes.

**Figura 1:** Microscopia óptica de tamanhos granulométricos do pó de folhas de *S. brasiliensis*.



Informações técnicas: Lens: MX(G) – 10C: OL – 140II: x140; H-view: 2215,150µm.

O tamanho médio de cada grânulo foi registrado como parâmetro de identificação e podem ser observados na tabela 1. A área de cada grânulo foi analisada, levando em consideração a amorfização de cada partícula, sendo analisada em apenas um plano, não sendo observada a relação tridimensional.

**Tabela 1:** Perímetro médio da granulometria dos pós.

Partículas	Perímetro Granulométrico (mm)
P1	428,029
P2	249,841
P3	76,089
P4	18,497
P5	13,491
P6	4,211

As folhas passaram por processo de trituração e o pó resultante possui variada granulometria, como observado na tabela 1 e na figura 1. A droga vegetal apresenta grânulos amorfos, devido a sua complexa composição química, que compreende inúmeros compostos pertencentes a variadas classes de metabólitos. A pulverização irregular de matéria prima de origem vegetal é comum, sendo a forma mais simples para o desenvolvimento de chá (RAITHORE; PETERSON, 2018).

A uniformização das partículas contribui para avaliação da ação biológica e também das características físico-químicas, como observado no trabalho desenvolvido por Merouane *et al* (2018), o qual separou macropartículas de micro e nanopartículas, obtendo um aumento na extração de compostos fenólicos com conseqüente aumento na atividade antioxidante da espécie vegetal *Phlomis crinita*, a medida que diminuía o tamanho de partícula. O estudo desenvolvido por Bovens *et al.* (2014) corrobora com esta informação ao identificar que a redução da massa e o controle do tamanho de partícula de drogas ilícitas contribui para análises quantitativas da mesma.

## **3.2 Análise fitoquímica**

### *3.2.1 Quantificação de metabólitos secundários*

A caracterização química de partes vegetais inicia com estudos de bioprospecção em grupo de compostos vegetais, tomando como base analítica um representante da classe metabólica em questão. Na tabela 2 está disposta a quantificação de polifenóis, tomando como parâmetro estruturas semelhantes ao ácido gálico; além do teor de flavonoides que toma como referência a quercetina; e os taninos que utilizou um teor de equivalentes de catequina. A presença destes metabólitos variou em função do tamanho granulométrico aplicado, de forma objetiva, a concentração detectada pelo método aumentou com a diminuição do tamanho de partícula. Esta observação se deve ao aumento da superfície de contato, o que facilita o aumento da solubilidade das partículas (AHLUWALIA *et al.* 2018).

O trabalho desenvolvido por Namdari *et al.* (2017) observou que o desenvolvimento de nanopartículas produzidas, a partir de plantas medicinais possui controle de extração melhor em relação aos demais tamanho, podendo inclusive direcionar os metabólitos para os efeitos farmacológicos desejados.

Os metabólitos secundários são produzidos pelas espécies vegetais de acordo com fatores como: o período de coleta, a sazonalidade, umidade, período de sombra e possíveis interações com predadores naturais. Portanto, a composição química está intimamente ligada ao potencial terapêutico e tecnológico da matéria prima vegetal (SUBRAMANI *et al.*, 2018). Desta forma, estes compostos são formados a partir da necessidade do organismo vegetal em se defender ou se adaptar ao ambiente em que está exposto.

**Tabela 2:** Teor de metabólitos secundários presentes nas folhas de *S. brasiliensis*.

<b>Tamanho Granulométrico</b>	<b>Teor de Polifenóis totais (mg/EAG.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Teor de Flavonoides (mg/EQU.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Teor de Taninos (mg/ECA.g<sup>-1</sup>)</b>
<b>P1</b>	0,18	0,05	0,06
<b>P2</b>	0,61	0,09	0,07
<b>P3</b>	0,50	0,12	0,09
<b>P4</b>	0,58	0,14	0,09
<b>P5</b>	0,63	0,19	0,10
<b>P6</b>	0,68	0,32	0,11

EAG: Equivalentes de ácido gálico; EQU: Equivalentes de quercetina; ECA: Equivalentes de catequina.

Entre os metabólitos avaliados, os polifenóis apresentaram maior concentração, sendo compostos que possuem um ou mais fenóis em sua estrutura química. Esse metabólito atua sobre a membrana plasmática causando a diminuição de adesinas, enzimas e polipeptídeos da célula, tendo assim ação sobre microrganismos como os fungos, além disso, são potentes antioxidantes (DONATI *et al.*, 2014). Santos *et al.* (2017) isolaram e identificaram compostos fenólicos a partir das folhas de *S. brasiliensis*, entre eles o ácido gálico ligados a grupamentos de glicopiranosídeo, além da catequina, nicoenosídeo e esquizandrisídeo.

Os flavonoides também são compostos fenólicos, no entanto os fenóis encontram-se separados quimicamente por três moléculas de carbono. A ação antifúngica desses metabólitos se deve a inibição de síntese de ácidos nucleicos impedindo a formação de pontes de hidrogênio entre bases nitrogenadas, além de perturbar as bicamadas lipídicas penetrando diretamente e interrompendo a função de barreira, como também podem provocar a fusão da membrana, resultando em vazamento de materiais intramembranosos (COWAN, 1999).

De forma semelhante os taninos podem atuar sobre o metabolismo dos microrganismos através da inibição de enzimas e da inativação de proteínas do envelope celular. No entanto, a atividade biológica e características da porção vegetal é desencadeada pela ação conjunta dos metabólitos secundários, não sendo necessário o isolamento ou síntese de compostos análogos (LIMA *et al.* 2006).

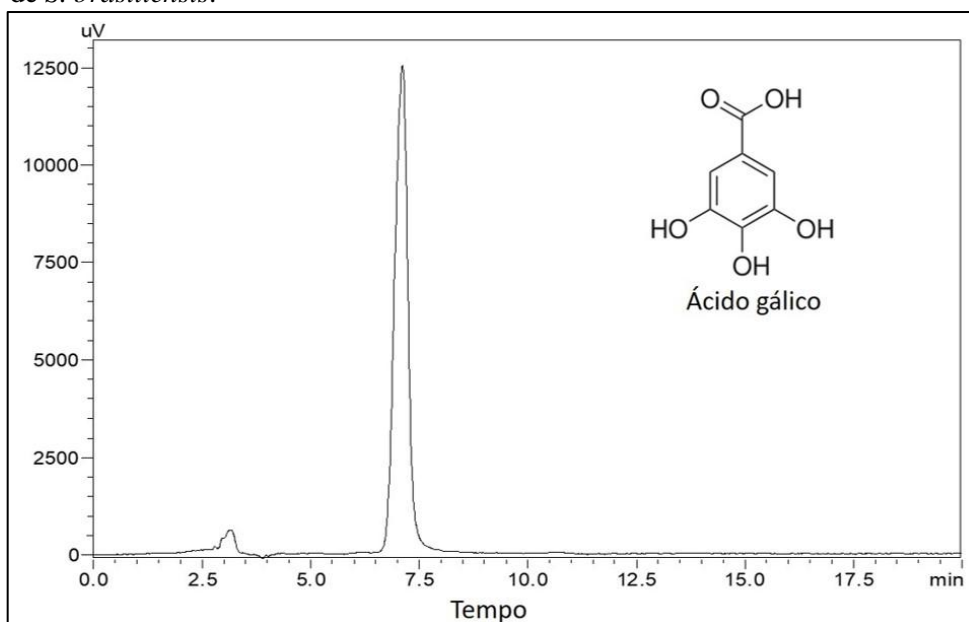


### 3.2.2 Análise cromatográfica

O controle de qualidade e a avaliação de autenticidade química de compostos vegetais pode ser realizada através da identificação de componentes majoritários, denominado marcador químico, o qual é representado por um composto químico que está presente em todos as amostras da espécie em questão (LIANG *et al.*, 2004). Diversas técnicas analíticas são citadas em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira (5ª edição), que envolvem técnicas qualitativas e quantitativas (SERESHTI *et al.* 2018).

A figura 2 apresenta o cromatograma da droga vegetal das folhas de *S. brasiliensis* no método de adição de padrão para identificar na droga vegetal um marcador químico. Neste trabalho, o ácido gálico foi identificado de forma qualitativa através do modelo analítico utilizando CLAE desenvolvido por Fernandes *et al* (2015).

**Figura 2:** Cromatograma do componente químico ácido gálico presente nas folhas de *S. brasiliensis*.



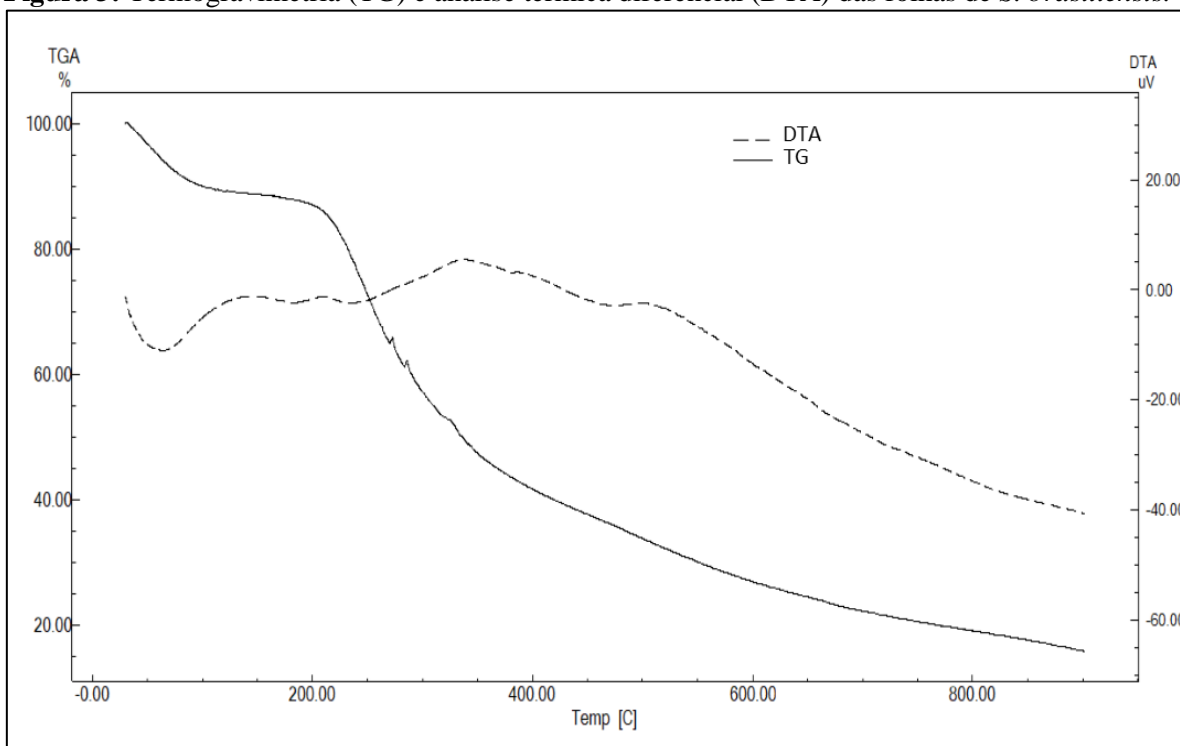
O marcador químico de droga vegetal é um valioso instrumento no controle de qualidade de produtos medicinais de origem vegetal, sendo utilizado no processo de desenvolvimento de medicamentos em escala industrial. Hoje também existe o conceito de “impressão digital” que vem do inglês *fingerprint*, onde esta ferramenta utiliza dados químicos para reconhecimento de padrão de forma computacional e assim identifica componentes químicos da droga vegetal, entre outras finalidades (POHL *et al.* 2018).

O trabalho desenvolvido por Santos *et al.* (2017) com a espécie *S. brasiliensis* identificou e quantificou diversos compostos fenólicos, ao todo foram 16 moléculas. Entre estes compostos estão a presença do ácido gálico e da catequina. O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) é a unidade básica de taninos hidrolisáveis sendo encontrado principalmente na casca e nas folhas das árvores (BAHRANI *et al.* 2018).

### 3.3 Análise térmica

A droga vegetal pulverizada obtida a partir das folhas da *S. brasiliensis* apresentou decomposição térmica em quatro estágios de perda de massa. Na figura 3 observa-se a análise termogravimétrica e a análise térmica diferencial da amostra, onde foi analisada sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de  $10\text{ C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Figura 3:** Termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) das folhas de *S. brasiliensis*.



A primeira perda de massa ocorre entre 46,04 e 73,30 °C, com perda de massa de 9,45%. Esta etapa provavelmente está relacionada ao desprendimento de compostos voláteis como óleos essenciais e compostos fenólicos, bem como perda de umidade (CORREIA *et al.* 2013). A vaporização destas substâncias mostra um teor inferior a 10%. Na DTA, este evento comportou-se de forma endotérmica e utilizou  $315,47\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ .

A segunda etapa de decomposição ocorre entre 218,40 e 266,52 °C, com perda de massa de 22,38%. Esta é a etapa que representa a maior perda de massa, onde provavelmente ocorre a degradação de componentes da matriz tecidual da planta com liberação de constituintes, podendo também estar relacionada com mudança de fase física. A energia envolvida para estas reações apresentada na DTA foi de 647,20 J.g<sup>-1</sup> em um evento exotérmico com liberação de energia.

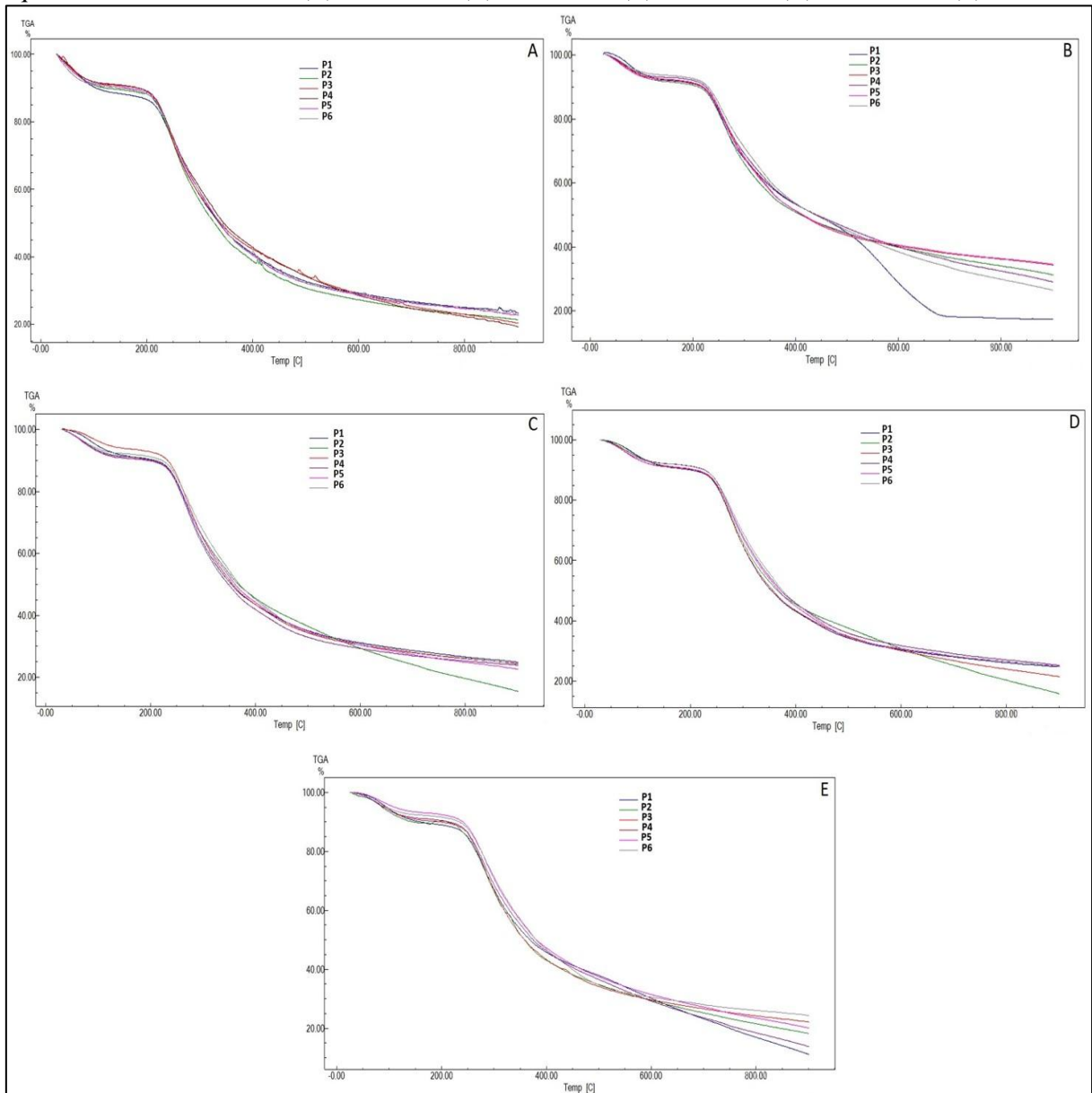
O terceiro evento ocorreu entre 287,61 e 295,78 °C com perda de 12,75% de massa, já o quarto evento tem início em 498,16 °C chegando a uma perda de massa de 19,72%. Estas etapas são consideradas o estágio primário de degradação para todos os fármacos e está associada a perda de carboidratos e compostos orgânicos (FERNANDES *et al.* 2013). Após as etapas de decomposição restam ainda 15,7% de matéria inorgânica que não se degrada a esta temperatura. As últimas etapas de decomposição necessitaram de 313,26 J.g<sup>-1</sup> em um evento exotérmico.

Na figura 4 estão dispostos as curvas termoanalíticas dos tamanhos granulométricos obtidos a partir das folhas de *S. brasiliensis*, analisados em diferentes razões de aquecimento. Observa-se uma sequência de eventos de perda de massa não bem definidos que pode estar relacionada com a composição química variada da droga vegetal (MEDEIROS *et al.* 2017).

Não foram observadas variações nas curvas decorrentes das variações granulométricas ou razão de aquecimento. No entanto a partícula P1, na razão de aquecimento de 20 °C.min<sup>-1</sup>, apresentou uma perda de massa acentuada mais expressiva quando comparada com as demais granulometria, mas esta característica não foi observada nas demais razões, podendo estar relacionada com a execução do experimento ou com propriedades aleatórias das amostra.

Correia *et al.* (2015) e Brandão *et al.* (2016) desenvolveram estudos semelhantes em relação a caracterização físico-química utilizando metodologias termoanalíticas, químicas e biológicas de droga vegetal de origem das espécies da *Tabebuia caraiba* e da *Momordica charantia*, respectivamente. Nestes estudos foram evidenciadas que variações como tamanho granulométrico, razão de aquecimento e alteração de atmosfera reagente e inerte são expressivas nas curvas termogravimétricas, sugerindo um modelo analítico para caracterização e controle de qualidade de drogas vegetais.

**Figura 4:** Curvas TG de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos e razões de aquecimentos de 10 °C.min<sup>-1</sup> (A), 20 °C.min<sup>-1</sup> (B), 30 °C.min<sup>-1</sup> (C), 40 °C.min<sup>-1</sup> (D) e 50 °C.min<sup>-1</sup> (E).



Na tabela 3 estão dispostas as perdas de massa do principal evento de decomposição térmica de todas as curvas e razões testadas, sendo demonstrado a temperatura inicial e final, além das energias envolvidas em cada evento apresentado. Observa-se um deslocamento das temperaturas iniciais de decomposição nas granulometrias P1, P3, P4, P5 e P6, a medida que a razão de aquecimento é aumentada, ou seja, o rápido fornecimento de energia para a droga vegetal deslocou os processos de degradação. Este deslocamento pode estar associado a diferenças na composições químicas em cada tamanho de partículas ou a uma maior proteção da matriz vegetal nas maiores partículas. Existem diferentes taxas de transferência de calor

para cada amostra e existe diferentes energias de ativação para degradação em cada tamanho de granulométrico (CORREIA *et al.* 2015).

**Tabela 3:** Decomposição térmica das amostras de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos.

Amostra	Razão (°C min <sup>-1</sup> )	Início (°C)	Final (°C)	Perda de Massa (%)
<b>P1</b>	10	224,29	330,17	58,23
	20	219,43	339,89	59,99
	30	237,68	356,09	57,14
	40	246,88	366,41	58,97
	50	251,93	342,67	54,47
<b>P2</b>	10	303,97	425,03	61,69
	20	304,16	370,66	50,09
	30	237,16	357,70	61,27
	40	241,96	361,84	64,41
	50	245,51	356,97	56,85
<b>P3</b>	10	229,47	524,72	59,38
	20	230,49	354,60	59,86
	30	239,21	357,51	59,40
	40	243,67	363,44	61,68
	50	251,53	366,52	60,39
<b>P4</b>	10	217,94	364,31	64,49
	20	232,71	344,04	63,66
	30	235,16	372,09	67,05
	40	243,36	373,08	62,11
	50	250,88	363,18	60,59
<b>P5</b>	10	218,44	347,80	60,18
	20	230,29	347,93	59,64
	30	236,95	364,87	58,25
	40	244,53	37,83	61,17
	50	252,88	368,41	58,22
<b>P6</b>	10	301,44	363,41	61,59
	20	229,49	371,92	66,92
	30	241,23	367,69	58,38
	40	243,47	386,41	58,58
	50	249,11	390,02	58,85

Portanto, as metodologias analíticas são sensíveis em relação a variações granulométricas e morfológicas em amostras de origem vegetal. Isto é corroborado no trabalho desenvolvido por Correia *et al.* (2011) que evidenciou a influência de variações de tamanho de partículas utilizando métodos termoanalíticos como a calorimetria exploratória diferencial, a termogravimetria e a pirólise acoplada a espectro de massa. São resultados semelhantes no estudo com a *S. brasiliensis*, onde os diferentes tamanhos de partículas apresentaram diferenças em sua composição química, além de observar na análise térmica que as partículas com maiores tamanhos apresentaram maior proteção em relação a matriz vegetal.

As granulometrias originadas das folhas da *S. brasiliensis*, quando analisadas por DTA apresentaram os eventos endotérmicos que são mostrados na tabela 4. As maiores partículas P1, P2 e P3 apresentaram quatro eventos, no entanto as partículas menores P4, P5 e P6 apresentaram apenas três eventos endotérmicos.

**Tabela 4:** Eventos endotérmicos da decomposição térmica das amostras de folhas de *S. brasiliensis* em diferentes tamanhos granulométricos

	1º evento		2º evento		3º evento		4º evento	
	T (°C)	Energia (J/g)	T (°C)	Energia (J/g)	T (°C)	Energia (J/g)	T (°C)	Energia (J/g)
P1	93,41	-406,34	138,46	-11,25	194,21	-24,21	292,17	-44,85
P2	105,16	-441,63	188,08	-29,06	208,71	-3,64	247,74	-5,49
P3	101,14	-522,58	187,16	-37,62	209,63	-4,74	296,70	-32,92
P4	86,47	-666,44	137,12	-13,01	207,46	-58,57	-	-
P5	101,56	-594,07	186,33	-36,57	186,33	-34,90	-	-
P6	100,22	-384,06	213,60	-18,67	212,45	-11,46	-	-

Observou-se a liberações de energia da droga vegetal de forma variada em relação as diferentes granulometrias, sugerindo que os eventos estão relacionados a uma perda de massa significativa da amostra. Verifica-se que as temperaturas corroboram com os dados obtidos nas curvas termogravimétricas, pois estes eventos ocorrem em temperaturas aproximadas das etapas de decomposição da TG. De acordo com Costa *et al.* (2013) estas faixas de temperaturas são próprias de desprendimento de água livre e ligada, além de compostos voláteis e também início de degradação de estruturas aromáticas e saturadas de átomos de carbono.

As menores partículas apresentaram apenas três eventos de absorção de energia, essa diferença em relação as partículas maiores pode estar associada à presença de macrocomponentes, como celulose e ligninas, que ocorrer em maiores quantidades em amostras com maiores tamanhos granulométricos, exigindo maior energia para degradar estes componentes (CORREIA *et al.* 2015).

#### 4 CONCLUSÃO

A separação em tamanhos granulométricos, bem como a uniformização do tamanho de partículas, apresentaram semelhanças no comportamento analítico. A matéria prima a partir das folhas de *S. brasiliensis* demonstraram-se amorfas, com diminuição do tamanho de partícula favorável a uniformidade granulométrica. Na análise fitoquímica foi possível quantificação de teores de polifenóis, flavonoides e taninos, onde as menores partículas associado com um aumento da superfície de contato possibilitou uma maior extração desses metabólitos. Como parâmetro de controle de qualidade químico, encontra-se o ácido gálico em condições satisfatória para identificação, sendo este dado corroborado por estudos anteriores e podendo indicar este componente como marcador químico da espécie. Nos estudos termoanalíticos foram observadas características contínuas quando variados parâmetros como razão de aquecimento e tamanho granulométrico da amostra. Em relação a análise de decomposição térmica e caracterização físico-química, as metodologias de TG e DTA foram confirmadas como adequadas e robustas para caracterização de droga vegetal, sendo observado que as maiores granulometrias apresentaram maior proteção e estabilidades da matriz vegetal, no entanto variações como razão de aquecimento e tamanho granulométricos podem ser aplicados para obtenção de droga vegetal com potencial utilização no desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos a partir as folhas de *S. brasiliensis*.

## REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, V.; ELUMALAI, S.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; SANGWAN, R. S. Nano silver particle synthesis using *Swertia paniculata* herbal extract and its antimicrobial activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. 1, p. 402-408, 2018.
- BAHRANI, S.; GHAEDI, M.; DANESHFAR, A. Fabrication of size controlled nanocomposite based on zirconium alkoxide for enrichment of Gallic acid in biological and herbal tea sample. **Journal of Chromatography B**, v. 1087-1088, n. 1, p. 14-22, 2018.
- BOVENS, M.; CSESZTREGI, T.; FRANC, A.; NAGY, J.; DUJUORDY, L. Sampling of illicit drugs for quantitative analysis- Part II. Study of particle size and its influence on mass reduction. **Forensic Science International**, v. 234, n. 1, p. 174-180, 2014.
- BRANDÃO, D. O.; GUIMARÃES, G. P.; SANTOS, R. L.; RAMOS-JÚNIOR, F. J. L.; SILVA, K. M. A.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. e7528297, 2016.
- CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 52, n. 11, p 3583–3589, 2004.
- CORREIA, P. L.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, C. P.; SANTOS, A. F. O.; CAVALCANTE, H. M. M.; MACÊDO, R. O. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1691–1698, 2013.
- CORREIA, P. L.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, C. P.; PINTO, M. F.; MOURA, E. A.; SANTOS, A. F. O.; MACÊDO, R. O. Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 122, n. 1, p. 207–214, 2015.
- COSTA, R. S.; NEGRÃO, C. A. B.; CAMELO, S. R. P. *et al.*, Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1959-1964, 2013.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology**. v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- DONATI, M.; MONDIN, A.; CHEN, Z.; MIRANDA, F. M.; FROLDI, G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, v. 12, n. 44, p. 1- 10, 2014.
- FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy an Introduction to Herbal Medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 1, p. 217-227, 2017.



FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS R. L. *et al.* Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 443-447, 2013.

FERNANDES, F. H. A.; BATISTA, B. S. A.; MEDEIROS, F. D.; SANTOS, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 208- 211, 2015.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromathography B**, v. 812, n. 1, p. 53-70, 2004.

LIMA, E. O. *et al.* avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**. v.16, n. 7-8. 2006.

LOPEZ, L.; VILLALBA, R. An assessment of *Schinopsis brasiliensis* Engler (Anacardiaceae) for dendroclimatological applications in the tropical Cerrado and Chaco forests, Bolivia. **Dendrochronologia**. v. 40, n. 1, p. 85-92, 2016.

MA, M. N.; UM, T. H.; Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v. 194, n. 1, p. 237-246, 2016.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanilin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 4, n. 1, 613-621, 1993.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p 571–577, 2005.

MOREIRA, B. O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *schinopsis brasiliensis* engl. (anacardiaceae).** 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

NAMDARI, M.; EATEMADI, A.; SOLEIMANINEJAD, M.; HAMMED, A. T. A brief review on the application of nanoparticle enclosed herbal medicine for the treatment of infective endocarditis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, n. 1, p. 321-331, 2017.

POHL, P.; POHL, A. B.; DZIMITROWICZ, A.; GREDA, K.; JAMROZ, P.; LESNIEWICZ, A.; MADEJAA, S. A.; WELNA, M. Understanding element composition of medicinal plants used in herbalism—A case study by analytical atomic spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 159, n. 1, p. 262-271, 2018.

RAITHORE, S.; PETERSON, D. G. Effect of polyol type and particle size on flavor release in chewing gum. **Food Chemistry**, v. 253, n. 1, p. 293- 299, 2018.

SANTOS, C. C. S.; MASULLO, M.; CERULLI, A.; MARI, A. *et al.* Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, v. 140, n. 1, p. 45- 51, 2017.

SERESHTI, H.; POURSORKH, Z.; ALIAKBARZADEH, G.; ZARRE, S. Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. **Food Control**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2018.

SUBRAMANI, K.; MURUGAN V.; SHANMUGAM B, K.; RANGARAJ, S.; PALANISAMY, M.; VENKATACHALAM, R.; SURESH, V. An ecofriendly route to enhance the antibacterial and textural properties of cotton fabrics using herbal nanoparticles from *Azadirachta indica* (neem). **Journal of Alloys and Compounds**, v. 723, n. 1, p. 698-707, 2017.