



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

**GIZELLY CAVALCANTE ALVES**

**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS A PARTIR DE EXTRATOS DE  
PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO UTILIZANDO PLANEJAMENTO  
QUADRADO LATINO**

**CAMPINA GRANDE  
2018**

**GIZELLY CAVALCANTE ALVES**

**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS A PARTIR DE EXTRATOS DE  
PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO UTILIZANDO PLANEJAMENTO  
QUADRADO LATINO**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

**Área de concentração:** Química Analítica.

**Orientador:** Prof. Dr. José Germano Vêras Neto.

**CAMPINA GRANDE  
2018**

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.

A474d Alves, Gizelly Cavalcante.  
Determinação de metabólitos secundários a partir de extratos de plantas do semiárido paraibano utilizando planejamento quadrado latino [manuscrito] : / Gizelly Cavalcante Alves. - 2018.  
40 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. José Germano Vêras Neto, Departamento de Química - CCT."

1. Fitoquímica. 2. Plantas medicinais. 3. Metabólitos secundários. 4. Quimiometria.

21. ed. CDD 660

GIZELLY CAVALCANTE ALVES

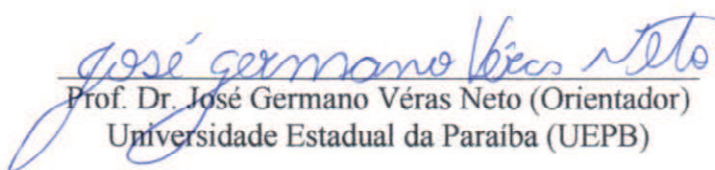
DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS A PARTIR DE EXTRATOS DE  
PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO UTILIZANDO PLANEJAMENTO  
QUADRADO LATINO

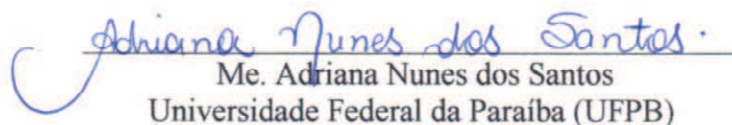
Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

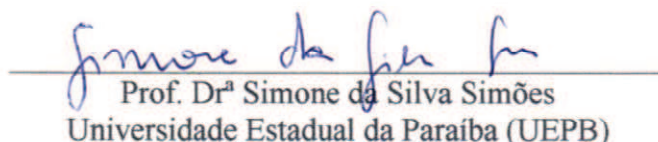
Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 19 / 06 / 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. José Germano Vêras Neto (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Me. Adriana Nunes dos Santos  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

  
Prof. Drª Simone da Silva Simões  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha mãe e meu pai, pela dedicação,  
companheirismo e amizade, DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela graça de me dar a vida e da conclusão desta graduação, por nunca ter me deixado desistir, mesmo quando às situações se tornaram difíceis.

Aos meus pais e meu irmão, por terem me apoiado e acreditado na minha força de vontade ao longo desse curso, por não medirem esforços em me ajudar a concretizar meus sonhos.

À minha família, em especial minha avó Maria das Dores, por todo apoio, paciência e compreensão por minha ausência nas reuniões familiares.

Aos meus amigos, em especial Jéssica, Karol, Raienny, Vanessa, Pamela, Lays, Felipe, Darlanny e Layslla, pelos momentos de amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de curso, em especial Juliana, Rossana, Bárbara, Suelly e Ronaldo, que foram essenciais para meu desempenho acadêmico, verdadeiros presentes que a graduação me deu e quero levar para o resto da vida.

Aos colegas de laboratório, em especial a Lucas, Widson, Naara e Ítala, que me ajudaram na execução desta pesquisa.

Ao meu orientador Germano Véras, por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos de pesquisa no LQAQ, só tenho a agradecer.

Aos professores da graduação, por todo ensinamento e aprendizado.

À UEPB, pela bolsa concedida.

*Nenhum dever é mais importante  
do que a gratidão.*

(Cícero)



## RESUMO

A busca de medicamentos fitoterápicos para o tratamento de diversas doenças vem se tornando uma prática cada vez mais utilizada pela população. As propriedades farmacológicas desses medicamentos são atribuíveis à presença de metabólitos secundários de plantas, produtos químicos que não são necessários para a sobrevivência imediata, mas que são sintetizados para aumentar a autodefesa da planta. A caracterização fitoquímica é parte integrante do que se chama de padronização do insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV), que consiste na etapa inicial para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico de qualidade. Desse modo, o trabalho tem como objetivo determinar e quantificar os metabólitos secundários das plantas *Ximenia americana* L (ameixa), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira), por meio da prospecção fitoquímica. As variáveis estudadas foram os tipos de planta, concentração de etanol e métodos extrativos, através do planejamento experimental QL (quadrado latino). A casca da ameixa apresentou a maior quantidade de polifenóis (461,31 mg/g) e taninos (231,55 mg/g), a partir da extração a 90% (v/v) de concentração de etanol e o método extrativo ultrassom. Seguido da folha da braúna para quantidade máxima de flavonoides (54,66 mg/g), com a concentração de etanol a 90% (v/v) e a turbólise como método de extração. De acordo com os resultados obtidos através do *software* Statistica (versão 10), foi concluído que para a determinação de flavonoides e taninos pode ser escolhido o método extrativo mais viável e a menor concentração de etanol, resultando em um experimento simples e de baixo custo.

**Palavras-Chave:** fitoquímica; *Ximenia americana* L; *Schinopsis brasiliensis* Engler; *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz; planejamento experimental.

## ABSTRACT

The search for herbal medicines for the treatment of several diseases has become a practice increasingly used by the population. The pharmacological properties of these drugs are attributable to the presence of secondary plant metabolites, chemicals that are not needed for immediate survival but are synthesized to enhance plant self-defense. Phytochemical characterization is an integral part of what is known as the standardization of the active vegetable pharmaceutical ingredient (IFAV), which is the initial stage for the development of a quality herbal medicine. Thus, the objective of this work is to determine and quantify the secondary metabolites of the plants *Ximenia americana* L (plum), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) and *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. queiroz (catingueira), through phytochemical prospection. The studied variables were the plant types, ethanol concentration and extractive methods, through the experimental design QL (Latin square). The plum bark presented the highest amount of polyphenols (461.31 mg / g) and tannins (231,55 mg / g), from the 90% (v / v) ethanol concentration extraction and the ultrasonic extraction method . Following the leaf of the Braunna to maximum amount of flavonoids (54.66 mg / g), with the ethanol concentration to 90% (v / v) and the turbolysis as extraction method. According to the results obtained through the software Statistica (version 10), it was concluded that for the determination of flavonoids and tannins the most viable extractive method and the lowest concentration of ethanol can be chosen, resulting in a simple and low cost experiment.

**Keywords:** phytochemistry; *Ximenia americana* L; *Schinopsis brasiliensis* Engler; *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P.; experimental planning.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1	Objetivo geral .....	12
2.2	Objetivos específicos .....	12
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
3.1	Plantas medicinais .....	13
3.2	Metabólitos secundários .....	14
3.2.1	Polifenóis totais .....	16
3.2.2	Flavonoides totais .....	17
3.2.3	Taninos condensados .....	19
3.3	Identificação de amostras .....	20
3.4	Quimiometria .....	21
3.4.1	Planejamento Quadrado Latino.....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1	Material vegetal e obtenção de extratos .....	23
4.2	Planejamento Quadrado Latino .....	24
4.3	Prospecção fitoquímica .....	24
4.3.1	Determinação do teor de polifenóis totais .....	25
4.3.2	Determinação do teor de flavonoides totais .....	25
4.3.3	Determinação do teor de taninos condensados .....	26
4.4	Análise Estatística dos Dados .....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
5.1	Prospecção fitoquímica .....	27
5.2	Análise Estatística .....	30
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais na prevenção e recuperação da saúde remonta ao início da civilização humana, já que a relação entre o homem e a natureza permitiu a transmissão de conhecimentos adquiridos relacionados ao uso e cultivos de várias espécies vegetais, além da alta disponibilidade, baixa toxicidade, risco mínimo de efeitos colaterais e principalmente aos baixos custos comparados aos medicamentos alopáticos (BESSA *et al.*, 2013).

A riqueza do ecossistema brasileiro tem potencial para colocar o país na linha de frente deste segmento do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico na indústria farmacêutica, mas para isso é necessário que a espécie vegetal em questão seja profundamente estudada com base em critérios científicos, na busca de outros princípios ativos e excipientes de origem vegetal.

No semiárido, a caatinga é a formação vegetal de maior predominância, indicada por sua heterogeneidade e por apresentar um número significativo de táxons raros e/ou endêmicos. A caatinga tem como característica a quantidade escassa de água no solo com período proeminente de estação seca, entre sete e dez meses; sua flora nativa aponta então características anatômicas, morfológicas e funcionais instruídas para a sobrevivência destas plantas a estas condições climáticas.

As propriedades farmacológicas de medicamentos fitoterápicos são atribuíveis à presença de metabólitos secundários de plantas, produtos químicos que não são necessários para a sua sobrevivência imediata, mas que são sintetizados para aumentar sua aptidão para sobreviver, permitindo que ela interaja com seu meio ambiente, incluindo patógenos e insetos herbívoros e simbióticos (KENNEDY & WIGHTMAN, 2011).

A pesquisa fitoquímica é relevante quando ainda não se tem entendimento sobre todos os estudos químicos, com o intuito de conhecer e avaliar, respectivamente, os compostos químicos das espécies vegetais e sua presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes. Desse modo, a fitoquímica é a área responsável pelo estudo desses princípios ativos de drogas vegetais, os quais fazem parte do metabolismo dos vegetais, fornecendo proteção para as plantas. Além disso, os metabólitos secundários possuem atividade biológica, oferecendo benefícios também à saúde humana.

Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2014), um marcador químico é um componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o

próprio princípio ativo e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

A primeira etapa no desenvolvimento de um fitoterápico de qualidade é a padronização do insumo farmacêutico ativo (IFAV) (SUSHMA *et al.*, 2011). Baseia-se na implementação de um sistema que possibilita garantir características predefinidas de quantidade, qualidade e efeito terapêutico do IFAV, assegurando reprodutibilidade na produção do medicamento fitoterápico (CHOUDHARY, SEKHON, 2011).

Desta forma, colaborando com os estudos de plantas do Nordeste brasileiro para a descoberta de novos compostos bioativos, este trabalho propõe, realizar prospecção fitoquímica para quantificação de metabólitos secundários, por espectrofotometria na região visível a partir dos extratos obtidos das plantas *Ximenia americana* L (ameixa), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira) existentes no Semiárido da Paraíba, utilizando planejamento experimental, no sentido de obter o melhor extrato de planta e revelar os fatores máximos e mínimos de influência, reduzindo, assim, o número de experimentos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar quantificação de metabólitos secundários a partir dos extratos das plantas *Ximenia americana* L (ameixa), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obter extratos das plantas selecionadas, utilizando diferentes concentrações de etanol (50, 70 e 90%) e diferentes métodos extrativos (maceração, turbólise e ultrassom);
- Realizar um tratamento estatístico, utilizando planejamento experimental do tipo quadrado latino, a partir dos resultados obtidos para determinação do extrato que possua uma maior quantidade de metabólitos secundários.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Plantas Medicinais

Tendo em vista que o Brasil possui um número muito grande de espécies vegetais que são consideradas medicinais, a aplicação de plantas para o tratamento de algumas doenças vem sendo consentido pela classe médica e por programas oficiais de saúde (COSTA, *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial depende do uso das plantas para suas necessidades básicas de saúde. O uso desse recurso está presente na China, Índia e norte da Ásia há pelo menos cinco mil anos (VASHIST; JINDAL, 2012).

Estudos exibem que no país 80% da população utilizam plantas medicinais como a principal fonte de recurso terapêutico, abrangendo cerca de 15 a 20% da biodiversidade mundial (SILVA, 2011). Além de possuir uma rica diversidade cultural e étnica, através de conhecimentos adquiridos de geração em geração, de modo empírico, sem entendimento do verdadeiro potencial terapêutico de determinada planta e sem uma adequada avaliação científica (SANTOS, 2013).

No Brasil encontramos vários Biomas, dentre eles os que são mais destacados: pantanal, cerrado, mata atlântica, caatinga e a floresta amazônica. A caatinga foi pouco explorada em épocas passadas, por acreditar que haveriam pequenas descobertas em sua vegetação, porém, recentemente, muitos estudiosos (SANTANA, 2016; SANTOS, 2013; SILVA, 2012) têm desenvolvido pesquisas nesse âmbito, no sentido de descobrir potenciais novos fármacos ou agentes medicamentosos. Têm-se verificado uma eficácia dos medicamentos naturais utilizados pela população, motivo qual tem despertado indústrias farmacêuticas para realização de pesquisas envolvendo esse bioma, na busca de novos princípios ativos e excipientes de origem vegetal, como já vem sendo relatado em várias literaturas nos últimos anos (SILVA, 2012; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2014).

A vegetação da Caatinga possui inúmeras utilidades, além de apresentarem uma grande importância biológica. As espécies que a caracterizam são lenhosas, herbáceas, sendo algumas com espinhos, além das cactáceas e bromeliáceas (SILVA, 2013). Dentre as inúmeras plantas existentes na Caatinga, as escolhidas para o presente estudo foram a *Ximenia americana* L (ameixa), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira), por acreditar que são plantas com elevado teor de metabólitos secundários, sendo promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos.

*Ximenia americana* L é comumente encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (BRASILEIRO *et al.*, 2008). É uma planta cosmopolita tropical com ocorrência silvestre, inclusive nos tabuleiros litorâneos do nordeste do Brasil, pertencente à família *Olacaceae*. Apresenta hábito arbóreo e é conhecida popularmente por vários nomes, dentre eles: ameixa silvestre, ameixa do mato ou ameixa da terra, dependendo da região onde se localiza (CHAVES *et al.*, 2014). Apontada como uma das espécies principais, a ameixa selvagem constitui o extrato arbustivo arbóreo da Caatinga. Na época de seca a maioria das plantas da Caatinga perde suas folhas, mas as ameixeiras são tolerantes a esse tipo de clima e permanecem com suas folhas totalmente verdes (SOUSA *et al.*, 2012).

*Schinopsis brasiliensis* Engler é uma árvore típica da caatinga, ocorrendo na Caatinga desde a Bahia até a Paraíba, com 10 – 12 metros de altura, podendo ter até 60 cm de diâmetro, as folhas são compostas de cor verde escura na parte superior e pálidas na inferior e com ramos providos de espinhos fortes pertencente à família *Anacardiaceae*, sendo o principal representante do gênero *schinopsis*, nativo do Brasil (DANTAS, 2007). É conhecida popularmente como braúna, baraúna, braúna-parda e braúna-do-sertão no Nordeste, chamacoco ou chamucoco no Pantanal mato-grossense (MOREIRA, 2016).

Dentre as espécies que ainda tem a necessidade de estudos encontra-se a catingueira (*Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz), com múltiplas utilidades tais como: potencial madeireiro, medicinal, uso veterinário, restauração florestal, forragem para o gado e aplicações industriais. A *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz é uma árvore oriunda da região da Caatinga, localizada no nordeste do Brasil. Esta árvore é mais conhecida como a “catingueira” ou “ pau-de-rato” (LIMA, 2014).

### **3.2 Metabólitos Secundários**

As plantas interagem com o meio ambiente, de modo que todos os componentes que estão a sua volta tornam-se fontes importantes para que estas reajam a um estímulo ambiental, gerando modificações bioquímicas celulares. Os produtos destas transformações são chamados, de forma geral, de metabólitos, que podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários. O metabolismo secundário é altamente influenciado pelo ambiente, ou seja, dependendo das condições ambientais é desviado para rotas diferenciadas produzindo produtos das mais diversas formas e variações durante a influência desta (SILVA, 2013; SIMÕES *et al.*, 2010).



Extratos de plantas exibem em sua composição substâncias efetivas que podem impedir ou reduzir a atividade dos agentes patógenos de plantas e animais. São praticamente inofensivos ao meio ambiente, quando comparados com derivados sintéticos, podendo até superar sua ação antimicrobiana (CUNICO *et al.*, 2004). A produção e acumulação dessas substâncias estão limitadas a um número restrito de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específico, características únicas, funcionando como elementos de diferenciação e especialização.

Dentre uma vasta quantidade de plantas medicinais com potencial terapêutico, grande parte delas sintetizam metabólitos secundários como substâncias de defesa, no momento em que são atacadas por fungos, bactérias, parasitas, vírus ou outros agentes. Os produtos gerados garantem vantagens para sua sobrevivência e para a continuidade da espécie em seu ecossistema, porém não são necessariamente essenciais para o organismo produtor. Metabólitos secundários compõem substâncias que possuem estruturas químicas e propriedades biológicas diversas (SÁ, 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários, de estrutura complexa, antimicrobianos, de baixo peso molecular, são produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos e são responsáveis pelo valor medicinal das plantas, mas diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e apenas em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenóides (monoterpenos, sequiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonoides) e compostos nitrogenados (alcaloides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos) (SIMÕES *et al.*, 2003).

Os principais fatores que podem influenciar a síntese de metabólitos secundários são a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Estes fatores alteram a quantidade e a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido. (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Além disso, também haverá influência em determinados segmentos da planta, visto que a concentração de metabólitos varia de acordo com a parte do vegetal selecionado.

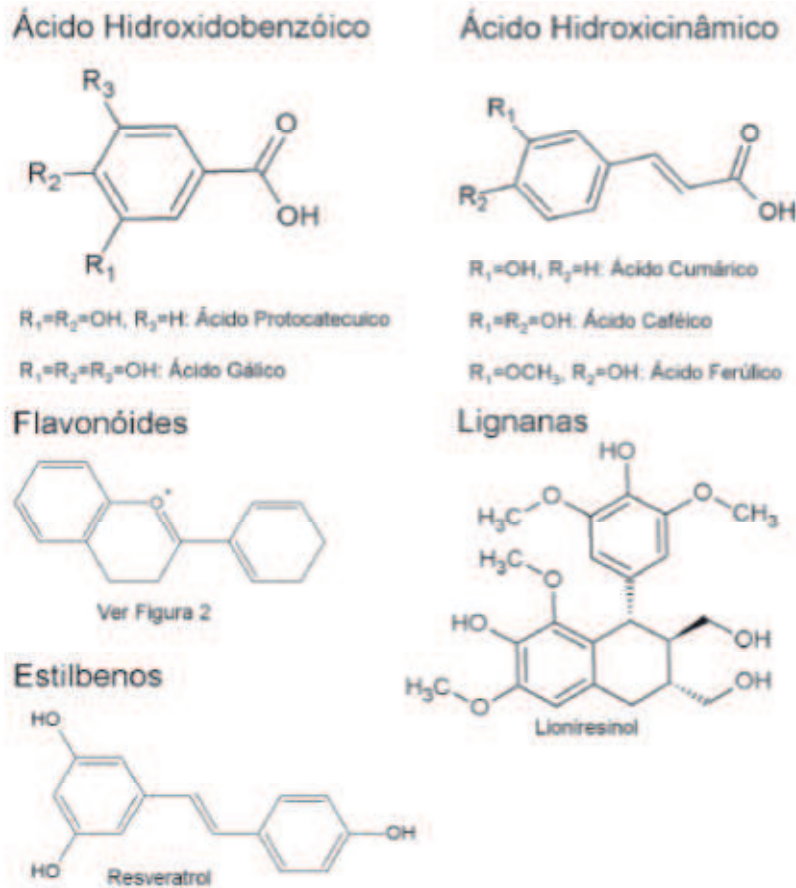
### 3.2.1 Polifenóis totais

O metabolismo secundário dá origem aos compostos fenólicos, sendo essenciais para crescimento e reprodução das plantas, além disso se formam em condições de estresse como infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros. A diversidade estrutural dos compostos fenólicos é resultante da ampla variedade de combinações que ocorre na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis (ANGELO, 2007).

Os compostos fenólicos apresentam uma, ou mais (polifenóis), hidroxila ligada a um anel benzênico e, apesar de conter um grupo característico de álcoois, esta classe de compostos dispõe de propriedades especiais. São compostos mais ácidos que os álcoois sendo oxidados mais facilmente (ARCHELA; ANTONIA, 2013). Os polifenóis constituem um grupo heterogêneo composto de várias classes de substâncias, que proporcionam benefícios à saúde, como antioxidante, antiviral, antimicrobiano, anticancerígeno, atividade anti-inflamatória, antitumoral, analgésica e antipirética (RAJBHAR *et al.*, 2015).

Os polifenóis são fitoquímicos poli-hidroxilados e representam uma grande variedade de compostos, que têm estruturas semelhantes. Estruturalmente, os polifenóis pertencem a muitas famílias diferentes, incluindo antocianinas, cumarinas, ligninas, flavonóides, taninos, quinonas, ácidos e fenóis. Esta diversidade estrutural resulta em grande variabilidade das propriedades físico-químicas que influenciam a extração de polifenóis. (FERNANDES, 2014). De forma geral, os compostos polifenólicos são classificados em quatro classes: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e estelbenos (Figura 1).

**Figura 1** – Estruturas químicas de polifenóis.



Fonte: ARCHELA; ANTONIA, 2013.

### 3.2.2 Flavonoides totais

Os flavonoides são um grupo de substâncias fenólicas, além de serem bem distribuídos pelo reino vegetal e destacado por suas diversificadas ações biológicas, possuem um amplo potencial farmacológico, dentre elas a eficiência de atuar sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico. Desse modo, os flavonoides representam uma alternativa promissora para tratamento de processos inflamatórios.

De modo geral, o número de hidroxilas contidas na sua estrutura influencia a atividade antioxidante dos flavonóides, atuando como doador rápido de hidrogênio e elétrons (MANACH *et al.*, 2004). Sua estrutura química é ideal para o sequestro dos radicais livres e quelação de íons de metais, sendo mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS *et al.*, 2006).

Possuem como estrutura básica um núcleo que consiste de 15 átomos de carbono, do tipo C6-C3-C6, sendo biossintetizados através das vias do ácido chiquímico e do ácido

acético, arrançados em dois anéis aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos, que possui um átomo de oxigênio (SIMÕES *et al.*, 2003).

**Figura 2** - Estruturas químicas dos flavonoides.



**Fonte:** ARCHELA; ANTONIA, 2013.

O nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico dos flavonoides são os causadores para as modificações no núcleo flavônico dessas substâncias, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. A partir destas reações são obtidas subclasses distintas, tais como: flavonóis, flavanonas, flavonas, antocianidinas, isoflavonas e flavanol (figura 2). Substituições dos anéis aromáticos resultam em diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (ANGELO; JORGE, 2007).

### 3.2.3 Taninos condensados

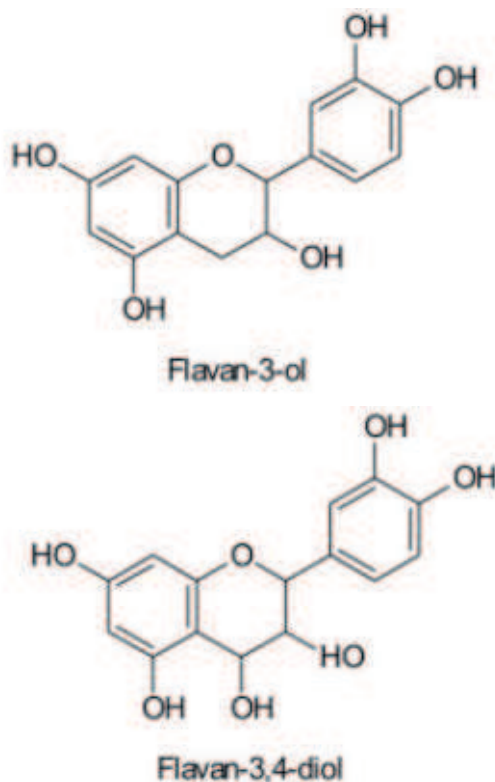
Os taninos são compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário das plantas que não apresentam-se na forma livre nos tecidos vegetais. São definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas e ajudam na autodefesa da planta, contra insetos e fungos. O termo 'taninos' é etimologicamente procedente da antiga raiz léxica celta 'tann-' que significa carvalho (NOZELLA, 2001).

Quimicamente, a classificação dos taninos é dividida em dois grupos: 1) Taninos hidrolisáveis, que tem como produto, após a hidrólise, carboidratos e ácidos fenólicos; e 2) Taninos condensados, que não são hidrolisáveis e são oligômeros dos grupos flavan-3-ols (catequina) ou flavan-3,4-diols (leucoantocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (Figura 3) (ANGELO; JORGE, 2007). Este último é a classificação de interesse para o presente estudo.

Esse grupo químico tem apresentado atividades biológicas e farmacológicas benéficas, como bactericida, anti-helmíntica e anti-hepatotóxica, inibição da replicação do HIV. As suas utilizações tradicionais incluem tratamentos de diarreia, envenenamento por metais pesados ou ulceração péptica leve. Taninos condensados também são úteis por seus efeitos antimicrobianos, anti-virais e anti-tumorais; e por os seus benefícios para a saúde em casos de doenças cardiovasculares, diabetes, problemas inflamatórios e efeitos na resposta imune inata.

Apesar de ser bem distribuído no citoplasma de qualquer célula vegetal, tais compostos possuem a concentração mais elevada, geralmente, dentro de cascas de árvores. Nesses locais, os taninos não afetam o metabolismo da planta, apenas depois da lesão ou morte eles atuam e têm metabolismo eficaz (BATTESTIN, 2008).

**Figura 3** - Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.



Fonte: ANGELO; JORGE, 2007.

### 3.3 Identificação de amostras

A legislação brasileira exige que, para o registro de um fitoterápico se faça a padronização dos extratos, procedendo simultaneamente com as análises quali e quantitativa do material vegetal e que seja especificado o teor de uma substância ou de um grupo de substâncias denominadas de marcadores (BRASIL, 2014).

Dessa forma, fica evidente que a investigação química de uma espécie vegetal baseada apenas no isolamento e caracterização estrutural de seus componentes não é mais suficiente e adequada às condições exigidas pela Ciência e que resultem em produtos manufaturados viáveis.

Uma forma de tentar solucionar e/ou minimizar os problemas anteriormente mencionados é empregar o uso de técnicas espectrofotométricas (região do visível), que vem se mostrando uma eficiente ferramenta no controle de qualidade de processos industriais, por apresentarem as seguintes vantagens: natureza não destrutiva e não invasiva, aplicabilidade universal (qualquer molécula contendo ligações CH, NH, SH ou OH), rapidez e baixo custo (PASQUINI, 2003).

### 3.4 Quimiometria

A quimiometria é uma área da química analítica, que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para analisar e solucionar problemas químicos, em especial dados multivariados. É basicamente dividida em três grandes áreas: reconhecimento de padrões, calibração multivariada, planejamento e otimização de experimentos (EMBRAPA, 2015).

No presente trabalho, houve a necessidade de utilizar o planejamento de experimentos, visando o interesse em saber quais as variáveis que exercem melhor desempenho na quantificação de metabólitos secundários. Nesta perspectiva, o planejamento experimental permite a eficiência e economia no procedimento experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta numa maior confiabilidade.

#### 3.4.1 Planejamento Quadrado Latino

No âmbito de delineamento experimental, deve-se considerar como etapas relevantes o planejamento de experimentos e a análise dos dados. Na etapa de planejamento será definido as melhores condições para o experimento, a quantidade e as condições em que devem ser coletados os dados durante um determinado experimento, as variáveis dependentes e independentes, com o intuito de obter a melhor resposta estatística possível e o menor custo. Na etapa de análise de dados, são utilizadas ferramentas estatísticas com o objetivo de informar quais variáveis independentes (tipo de planta, concentração de etanol e métodos extrativos) foram significativas para as variáveis dependentes (quantificação de metabólitos secundários) (DOE, 2014).

A principal característica do planejamento quadrado latino (QL) é sua capacidade de lidar simultaneamente com duas fontes conhecidas de variação entre as unidades experimentais. Ele trata as fontes como dois critérios de bloqueio independentes: as linhas (homogêneas para um fator de variabilidade nas unidades experimentais) e as colunas (homogêneas para o outro fator de variação nas parcelas). O bloqueio bidirecional em um planejamento QL, conhecido como bloqueio de linha, é realizado garantindo que cada linha e cada coluna receba cada tratamento uma única vez. (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

O delineamento em blocos casualizados inclui o modelo matemático e a análise da variância para o quadrado latino, onde os blocos são estruturados nos dois sentidos e são tradicionalmente referidos como linhas (estrutura de blocos no sentido horizontal) e como

colunas (estrutura de blocos no sentido vertical). O modelo matemático para variável resposta referente a  $i$ -ésima linha com a  $j$ -ésima coluna, de acordo com Mead (1988), pode ser descrito pela seguinte equação:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_{k(ij)} + \varepsilon_{ij}$$

onde,

$y_{ij}$  é o valor de uma observação correspondente a  $i$ -ésima linha na  $j$ -ésima coluna na  $k$ -ésima parcela;

$\alpha_i$  é o efeito da  $i$ -ésima linha;

$\beta_j$  é o efeito da  $j$ -ésima coluna;

$\tau_{k(ij)}$  é o efeito do  $k$ -ésimo tratamento;

$\varepsilon_{ij}$  é o erro experimental associado a  $i$ -ésima linha na  $j$ -ésima coluna na  $k$ -ésima parcela com  $\varepsilon_{ij} \stackrel{IID}{\sim} N(0, \sigma^2)$  (ANJOS, 2005).

Esse tipo de planejamento possui como principais objetivos a permissão da estimativa do erro experimental, contribuir para aumentar a precisão dos experimentos e fornecer informações sobre o procedimento mais apropriado para proceder os testes de significância (NOGUEIRA *et al.*, 2000).

A presença de bloqueio de linha e bloqueio de coluna em um planejamento QL, embora seja útil para cuidar de duas fontes independentes de variação, também se torna uma restrição importante no uso do quadrado latino. Isso acontece já que o requisito de que todos os tratamentos apareçam em cada bloco de linhas e em cada bloco de colunas pode ser satisfeito apenas se o número de replicações for igual ao número de tratamentos. Como resultado, quando o número de tratamentos é grande, o planejamento se torna impraticável devido ao grande número de replicações necessárias. Por outro lado, quando o número de tratamentos é pequeno, o grau de liberdade associado ao erro experimental torna-se pequeno demais para que o erro seja estimado com segurança (SERAPHIN, 1996; CALADO, V. 2003).

Os planejamentos QL mais comuns são os  $5 \times 5$ ,  $6 \times 6$  e  $7 \times 7$ , pois apresentam um número razoável de graus de liberdade do resíduo (ANJOS, 2005). No entanto, para esta pesquisa foi utilizado um quadrado latino  $3 \times 3$ , por apresentarem duas variáveis qualitativas e uma variável quantitativa, não sendo possível utilizar um planejamento fatorial.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e obtenção dos extratos

As folhas de *S. brasiliensis* Engler (braúna) e as cascas de *X. americana* L. (ameixa) e *P. pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (catingueira) foram coletadas em um sítio particular no município de Pocinhos na região semiárida do Estado da Paraíba. A identificação das espécies vegetais e depósito das exsiccatas foram realizados no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes localizado na Universidade Federal de Campina Grande – PB.

A metodologia empregada para seleção do extrato utilizado seguiu um planejamento quadrado latino 3 x 3, com medidas em triplicatas, tendo como fatores os métodos extrativos (maceração, turbólise e ultrassom), a concentração da solução hidroalcoólica (50, 70 e 90 %) e a as plantas estudadas (ameixa, braúna e catingueira).

As partes coletadas das plantas, foram individualmente secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C, até obter constância no peso do material. Posteriormente foram pulverizadas em moinho de facas com malha de 10 mesh. Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos por três diferentes métodos extrativos (maceração, turbólise e ultrassom) utilizando como solvente água:etanol em diferentes proporções (50:50, 30:70 e 10:90, v/v).

A maceração foi realizada de forma estática, sem renovação de solvente, acondicionando as soluções extrativas em vidro âmbar durante 7 dias, sob agitação ocasional. A extração por ondas ultrassônicas procedeu-se submetendo as soluções preparadas à aparelhagem adequada (Lavadora ultrassônica – UNIQUE modelo Ultrasonic Cleaner), em banho-maria a 40°C, por um período de 60 minutos. A extração por turbólise foi exercida em aparelho Ultra-turrax® a uma taxa de rotação de 6.000 rpm por 15 minutos, no qual a solução extrativa permaneceu em banho gelado para manutenção da temperatura.

Os extratos foram então filtrados e em seguida concentrados em evaporador rotativo (Spray dryer - LabMaq MSD 0.5) para retirada do solvente, obtendo assim os extratos secos, que foram armazenados em frascos de plásticos e conservados na geladeira. As soluções extrativas foram preparadas para atingir uma concentração final de 20 % (p/v) de material vegetal. Após produzidos os extratos foram submetidos a prospecção fitoquímica.

## 4.2 Planejamento Quadrado Latino

O delineamento do planejamento Quadrado Latino foi feito de acordo com a Tabela 1, nesta estão apresentados seus níveis e variáveis, tendo como variáveis de resposta o teor polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados. Como é apresentado na tabela 2, foram realizados 9 experimentos, em triplicata, para cada metabólito secundário, totalizando 81 ensaios.

**Tabela 1** – Variáveis estudadas para o planejamento quadrado latino.

Fatores	Níveis		
	1	2	3
Tipo de Planta (A)	Ameixa - Casca	Braúna - Folha	Catingueira - Casca
Concentração de Etanol (B)	50%	70%	90%
Método de Extração (C)	Ultrassom	Turbólise	Ultrassom

**Fonte:** autor.

**Tabela 2** – Matriz do planejamento quadrado latino.

Número de experimentos	Tipo de Planta (A)	Concentração de etanol (B)	Método de extração (C)
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	3
5	2	2	1
6	2	3	2
7	3	1	2
8	3	2	3
9	3	3	1

**Fonte:** autor.

## 4.3 Prospecção fitoquímica

Foi realizado um estudo quantitativo, por espectrofotometria, na região do visível, utilizando o espectrofotômetro UV/Vis/NIR LAMBDA™ 750, dos principais metabólitos secundários (polifenóis, flavonoides e taninos) presentes nas cascas de ameixa, catingueira e nas folhas de braúna. Essa caracterização foi realizada com a finalidade de identificar os

constituintes presentes em maior quantidade nas espécies estudadas. Os comprimentos de onda foram escolhidos a partir de uma varredura, e assim foi selecionado o pico característico de cada amostra.

#### **4.3.1 Determinação do teor de Polifenóis totais**

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). A curva padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações, entre 3 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , de ácido gálico e as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 757 nm. Distribuiu-se, em cada tubo de ensaio, 0,5 mL da solução do reagente de Folin-Ciocalteu 1N e posteriormente, 0,5 mL das respectivas soluções de extrato. As concentrações dessas soluções foram escolhidas através de testes preliminares, com o intuito dos valores das absorbâncias estarem dentro da faixa da curva de calibração. Os tubos ficaram em repouso por 2 minutos, à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (m/v). Os tubos ficaram em repouso novamente, por 10 minutos até a reação ser completada. Transferiu-se o conteúdo dos tubos para uma cubeta e realizou-se a leitura a 757 nm no espectrofotômetro UV/Vis/NIR LAMBDA™ 750 (Perkin Elmer).

#### **4.3.2 Determinação do teor de Flavonoides totais**

Para a determinação do teor de flavonoides totais, utilizou-se o método descrito por Meda *et al*, 2005. A curva padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações, entre 2 e 28  $\mu\text{g/mL}$ , de quercetina e as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 415 nm. Distribuiu-se, em cada tubo de ensaio, 1,5 mL da solução, de  $\text{AlCl}_3$  a 2% em metanol (p/v) e posteriormente, 1,5 mL das respectivas soluções de extrato (em metanol). As concentrações foram escolhidas através de testes preliminares, com o intuito dos valores das absorbâncias estarem dentro da faixa da curva de calibração. Os tubos ficaram em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente (25 °C). Transferiu-se o conteúdo dos tubos para uma cubeta e realizou-se a leitura a 415 nm no espectrofotômetro UV/Vis/NIR LAMBDA™ 750 (Perkin Elmer).

### 4.3.3 Determinação do teor de Taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993). A curva padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações, entre 10 e 451 µg/mL, de catequina e as absorvâncias foram medidas no comprimento de onda de 500 nm. Distribuiu-se, em cada tubo de ensaio, 1,5 mL da solução de vanilina (4% p/v em metanol) e posteriormente, 0,25 mL das respectivas soluções de extrato (em metanol). As concentrações foram escolhidas através de testes preliminares, com o intuito dos valores das absorvâncias estarem dentro da faixa da curva de calibração. Distribuiu-se, 0,75 mL de HCl P.A. Os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos, imersos em água a cerca de 22 °C. Transferiu-se o conteúdo dos tubos para uma cubeta e foi realizada a leitura a 500 nm no espectrofotômetro UV/Vis/NIR LAMBDA™ 750 (Perkin Elmer).

### 4.4 Análise Estatística dos Dados

A partir da equação fornecida pelas curvas de calibração foi calculada a concentração experimental (em µg/mL) dos metabólitos secundários nas soluções dos extratos. Para encontrar o teor de polifenóis, flavonoides e taninos condensados foi utilizada a seguinte equação:

$$T\% = \frac{C_{\text{exp}} (\mu\text{g/mL}) \times 100}{C_{\text{solução}} (\mu\text{g/mL})}$$

onde,

$C_{\text{exp}}$  é a concentração experimental de cada metabólito secundário;

$C_{\text{solução}}$  é a concentração do extrato.

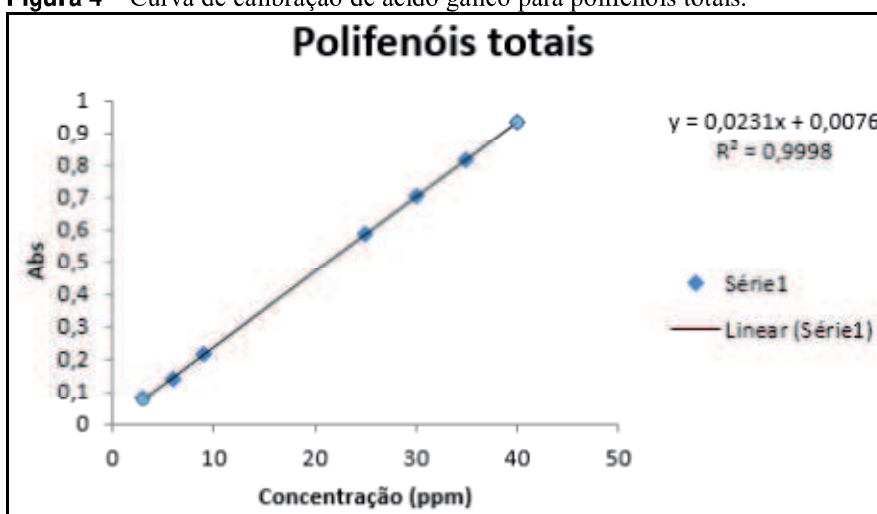
Posteriormente realizou-se a conversão para a unidade que é mais comumente utilizada (mg de padrão/g de extrato) e os dados obtidos foram tratados no software *Statistica*, versão 10.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Prospecção Fitoquímica

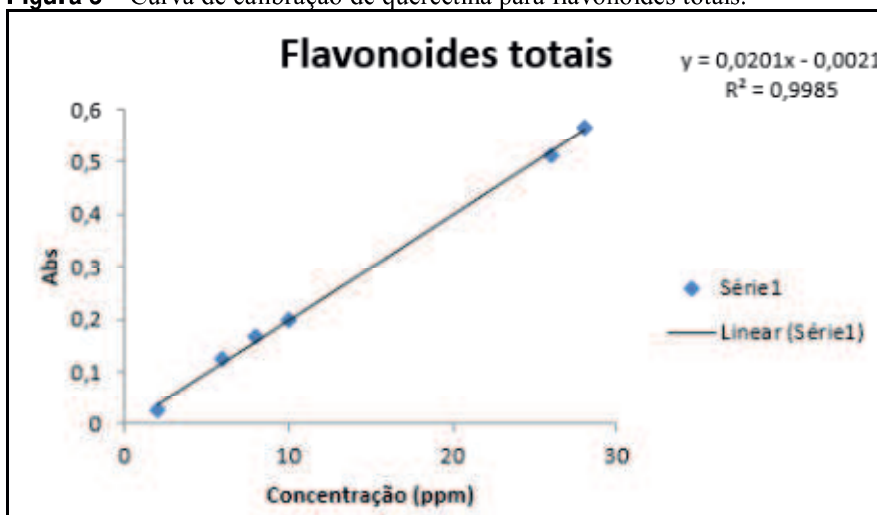
A seguir, nas Figuras 4, 5 e 6 estão apresentadas as curvas de calibração para cada metabólito secundário estudado. Para determinação de polifenóis foi utilizada a equação de calibração de ácido gálico:  $y = 0,0231x + 0,0076$  ( $R^2 = 0,9998$ ). Para flavonoides, a equação de calibração de quercetina:  $y = 0,0201x - 0,0021$  ( $R^2 = 0,9985$ ). E por fim, para taninos condensados, a equação de calibração de catequina:  $y = 0,0032x + 0,0679$  ( $R^2 = 0,9982$ ).

**Figura 4** – Curva de calibração de ácido gálico para polifenóis totais.

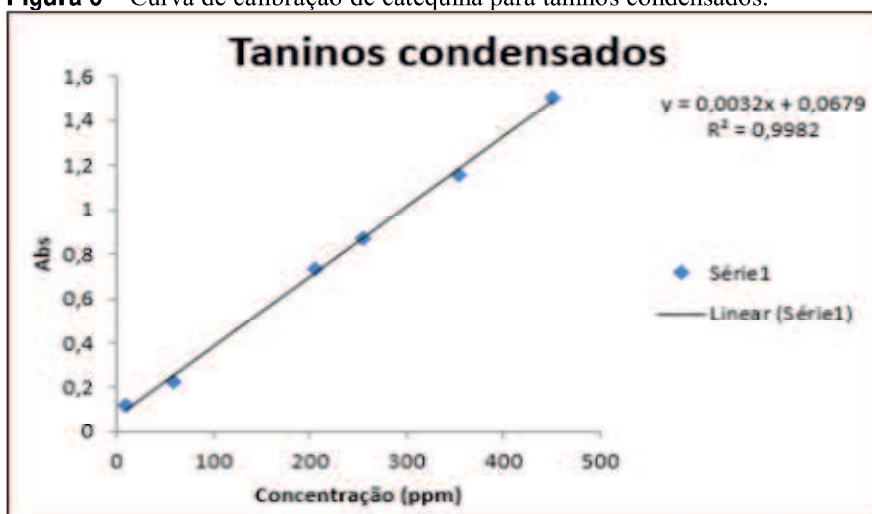


Fonte: autor.

**Figura 5** – Curva de calibração de quercetina para flavonoides totais.



Fonte: autor.

**Figura 6** – Curva de calibração de catequina para taninos condensados.

Fonte: autor.

Os resultados da caracterização fitoquímica quantitativa, a partir do planejamento quadrado latino, estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Quantidade de metabólitos secundários (polifenóis, flavonoides e taninos condensados) dos extratos obtidos por prospecção fitoquímica.

Tipo de Planta (A)	Concentração de etanol (B)	Método de Extração (C)	Polifenóis totais $\pm$ DP (mg/g)	Flavonoides totais $\pm$ DP (mg/g)	Taninos condensados $\pm$ DP (mg/g)
<b>Ameixa - Casca</b>	50	Maceração	385,52 $\pm$ 15,90	14,79 $\pm$ 0,70	217,30 $\pm$ 5,22
	70	Turbólise	453,32 $\pm$ 8,90	19,29 $\pm$ 0,65	221,26 $\pm$ 10,84
	90	Ultrassom	461,31 $\pm$ 7,91	21,19 $\pm$ 0,76	231,55 $\pm$ 16,46
<b>Braúna - Folha</b>	50	Ultrassom	316,95 $\pm$ 6,34	46,71 $\pm$ 2,99	7,18 $\pm$ 0,98
	70	Maceração	332,94 $\pm$ 5,16	46,10 $\pm$ 3,13	3,19 $\pm$ 0,36
	90	Turbólise	349,54 $\pm$ 6,47	54,66 $\pm$ 1,16	2,20 $\pm$ 0,31
<b>Catingueira - Casca</b>	50	Turbólise	267,27 $\pm$ 3,54	30,61 $\pm$ 2,90	15,27 $\pm$ 0,97
	70	Ultrassom	272,64 $\pm$ 3,32	35,09 $\pm$ 4,63	21,11 $\pm$ 3,05
	90	Maceração	278,18 $\pm$ 7,38	21,64 $\pm$ 5,30	21,00 $\pm$ 3,29

Fonte: autor.

Na determinação fitoquímica quantitativa dos extratos das plantas medicinais, foi observado que a *Ximenia americana* L. (ameixa) contém as quantidades mais elevadas de

polifenóis e taninos condensados, enquanto a *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) possui a maior quantidade de flavonoides. Segundo ÚCHOA *et al*, 2016, o extrato etanólico da casca do caule da ameixeira apresentou um teor total de fenólicos de 678,66 mg de EAG. Já para SANTANA, 2016, o extrato etanólico a 70% (v/v) apresentou um valor de 160,08 mg/g  $\pm$  1,15 para polifenóis totais, 11,26 mg/g  $\pm$  0,06 para flavonoides totais e 94,75 mg/g  $\pm$  0,51 para taninos condensados. No presente estudo observa-se que a planta segue o mesmo comportamento dos trabalhos citados anteriormente, apresentando uma maior quantidade de polifenóis (valor máximo de 461,31 mg/g  $\pm$  7,91), e taninos (valor máximo de 231,55 mg/g  $\pm$  16,46), enquanto para flavonoides o número é bem inferior (valor máximo de 21,19 mg/g  $\pm$  0,76). Podendo levar em consideração que a concentração de etanol à 90% (v/v) e a ultrassom como método de extração levam a uma maximização dos resultados para esses metabólitos.

No estudo de SOUZA (2015) a quantificação do extrato etanólico na proporção de 80:20 (etanol:água) de *S. brasiliensis* Engler apresentou os seguintes valores: 598,55 mg/g para polifenóis totais, 6,94 mg/g para flavonoides totais e 15,83 mg/g para taninos condensados. Em comparação, com esta pesquisa, a quantificação para polifenóis foi menor, com um valor máximo de 349,54 mg/g  $\pm$  6,47, seguido de uma concentração maior de 54,66 mg/g  $\pm$  1,16 para flavonoides e uma menor 7,18 mg/g  $\pm$  0,98 para taninos. Considera-se que a concentração de etanol à 90% (v/v) e a turbólise como método de extração interferem positivamente no aumento dos dois primeiros metabólitos estudados, à medida que a concentração de etanol à 50% (v/v) e a ultrassom como método de extração influencia em um pequeno aumento na quantidade de taninos.

CHAVES (2016) utilizou o extrato de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz e obteve as seguintes concentrações de extrato etanólico, tendo a concentração de etanol:água 50% (v/v) como solvente: 36,94 mg/g  $\pm$  0,45 para polifenóis totais, 19,09 mg/g  $\pm$  0,78 para flavonoides totais e 59,08 mg/g  $\pm$  0,69 para taninos condensados. Nesta pesquisa, os resultados foram bem maiores para polifenóis (concentração de etanol à 90% (v/v) e a maceração como método de extração), com um valor máximo de 278,18 mg/g  $\pm$  7,38, seguido de 35,09  $\pm$  4,63 para flavonoides e 21,11  $\pm$  3,05 para taninos, na concentração de etanol à 70% (v/v) e a ultrassom como método de extração para estes últimos.

Pôde-se perceber que alguns valores da pesquisa não apresentam concordância com a literatura. Localização geográfica da coleta da planta, nível de água no solo, taxa de evapotranspiração, intensidade luminosa, eficiência fotossintética, potencial hídrico vegetal, estágio da planta, tempo, condição de armazenamento do extrato e diluição da solução de

extrato para que a concentração estivesse dentro da linearidade são fatores que respondem diretamente a essas variações (LARCHER 2004; TAIZ, ZEIGER, 2004).

## 5.2 Análise Estatística

Foi realizado o planejamento quadrado latino, com o objetivo de verificar se haveria diferença na concentração dos metabólitos secundários, em função dos tipos de planta, concentração de etanol e métodos de extração. Para validação do modelo matemático foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados, apresentadas nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente, as quais exibem a significância dos efeitos a 95% de nível de confiança.

**Tabela 4** - Análise de variância do planejamento quadrado latino para polifenóis totais.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Tipo de Planta	118625,8	2	59312,91	434,4547	0,000000
Concentração	7714,0	2	3857,02	28,2519	0,000001
Método de Extração	2897,8	2	1448,89	10,6128	0,000722
Falta de Ajuste	2730,5	20	136,52		
Total	131986,1	26			

Fonte: autor.

**Tabela 5** - Análise de variância do planejamento quadrado latino para flavonoides totais.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Tipo de Planta	4380,794	2	2190,397	95,00437	0,000000
Concentração	35,964	2	17,982	0,77994	0,471884
Método de Extração	145,043	2	72,522	3,14549	0,064898
Falta de Ajuste	461,115	20	23,056		
Total	5022,916	26			

Fonte: autor.

**Tabela 6** - Análise de variância do planejamento quadrado latino para taninos condensados.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Tipo de Planta	269938,3	2	134969,2	2897,641	0,000000
Concentração	114,4	2	57,2	1,228	0,314001
Método de Extração	263,4	2	131,7	2,827	0,082914
Falta de Ajuste	931,6	20	46,6		
Total	271247,7	26			

Fonte: autor.

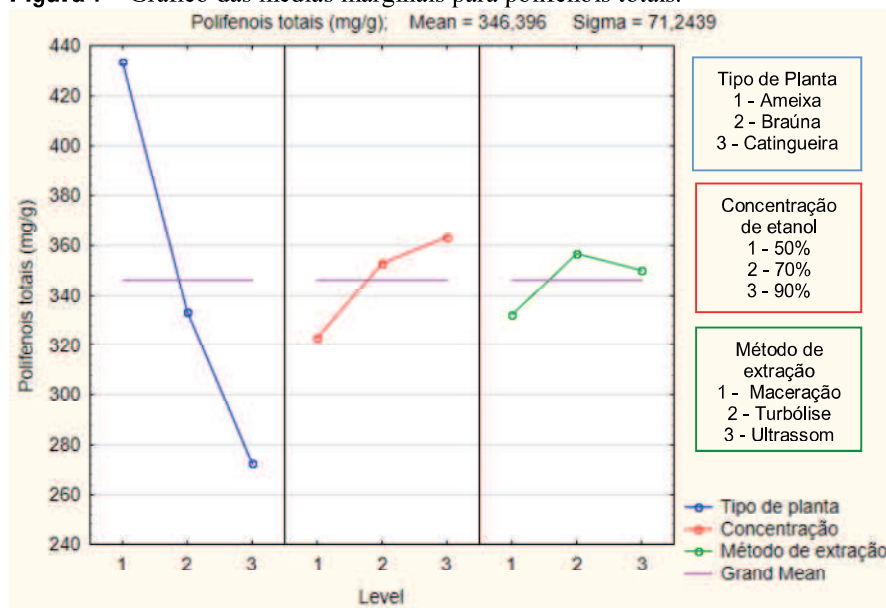


Analisando os efeitos dos fatores, observa-se que para polifenóis totais, todos os fatores foram estatisticamente significativos para o modelo ( $p \leq 0,05$ ). Isso pode ser explicado pelo fato dos polifenóis apresentarem características fenólicas comuns e pelas altas concentrações encontradas em todos os tipos de plantas analisadas neste trabalho, mostrando que a concentração de etanol a 90% (v/v) é mais significativo para uma maior quantidade de polifenóis, variando apenas os métodos de extração.

Entretanto para flavonoides totais e taninos condensados apenas o tipo de planta foi um fator significativo, mostrando que a concentração de etanol e o método de extração não precisam ser alterados para obtenção de um maior teor de metabólitos secundários.

Na figura 7, 8 e 9 estão expostos os gráficos das médias marginais estimadas para os níveis de fatores, contendo informações referentes aos valores médios dos metabólitos secundários para cada variável estudada.

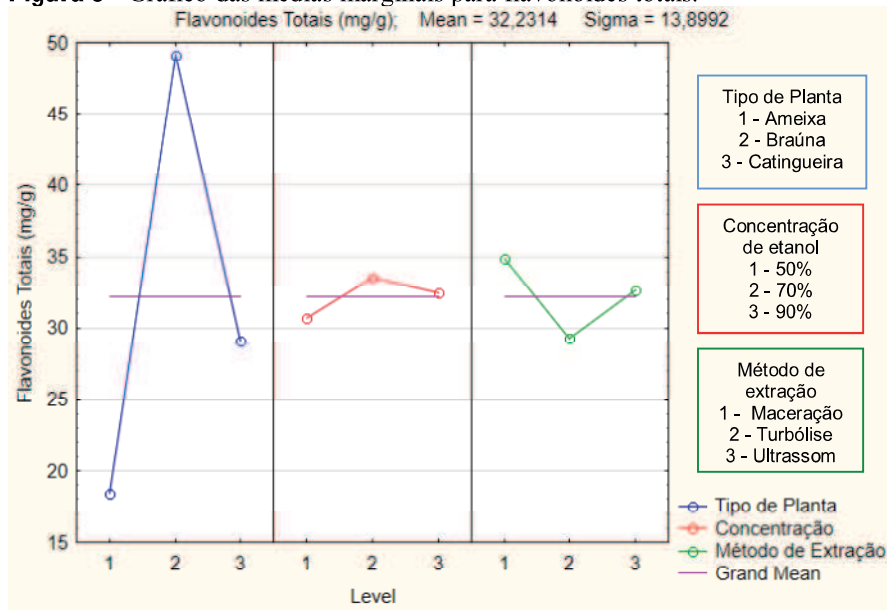
**Figura 7** - Gráfico das médias marginais para polifenóis totais.



Fonte: autor.

Avaliando a figura 7, observa-se uma ampla variância, para influência da quantificação de polifenóis, entre a casca da ameixa e a casca da catingueira. A casca da ameixa apresenta um maior teor de polifenóis (433,3878 mg de ácido gálico/g de extrato). Como os outros fatores são significativos, a concentração na proporção de etanol:água (90:10) e o método extrativo de turbólise também apontam na maximização desses resultados.

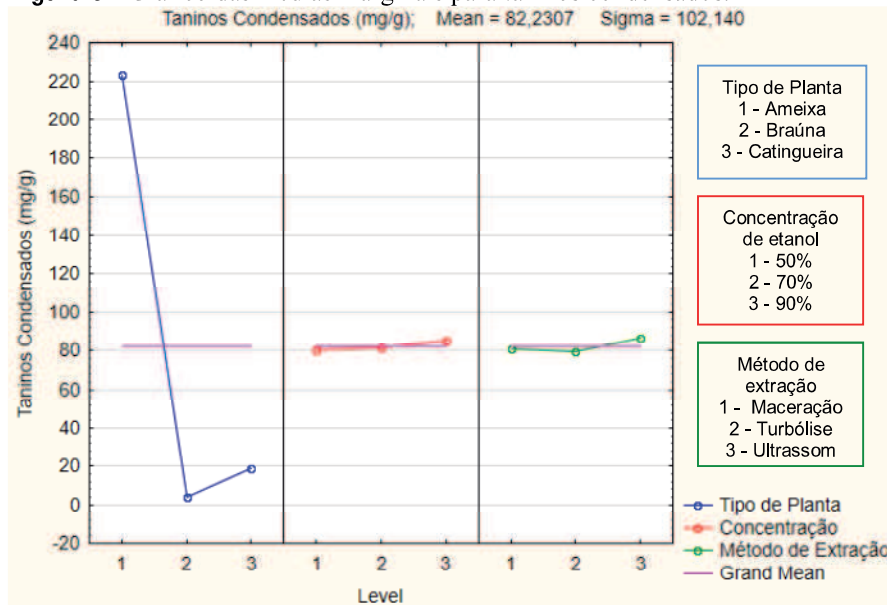
**Figura 8** - Gráfico das médias marginais para flavonoides totais.



Fonte: autor.

Na figura 8, observa-se que a folha da braúna exerce positivamente na influência da quantificação de flavonoides totais (49,15565 mg de quercetina/g de extrato), já a concentração de etanol e o método de extração não possuem uma variação expressiva, tendo em vista que a diferença máxima é de apenas 5,63405 mg/g, corroborado pela ANOVA, entre o método de maceração e turbólise, podendo ser escolhido a menor concentração de etanol e o método de extração mais acessível.

**Figura 9** - Gráfico das médias marginais para taninos condensados.



Fonte: autor.

A figura 9 exibe uma alta variação entre a ameixa e as demais plantas, demonstrando que a primeira planta contém uma quantidade bem superior de taninos condensados (223,3726

mg de catequina/g de extrato) ao mesmo tempo que as diferentes concentrações de etanol e os métodos extrativos não apresentam praticamente nenhuma variação. Podendo ter como recomendação a utilização da menor concentração de etanol e do método de extração mais viável, resultando em um menor custo e tempo de análise.

Sendo assim, foi possível determinar e quantificar os extratos, identificando as variáveis que mais influenciaram na quantificação dos metabólitos secundários e obtendo resultados satisfatórios a partir das equações de calibração. O quadrado latino foi escolhido, por terem poucas pesquisas na literatura e pela redução de experimentos comparados a outros planejamentos, pois são realizados apenas 9 experimentos (3x3), podendo atribuir as replicatas para uma maior confiabilidade nos resultados.

## 6 CONCLUSÃO

A caracterização fitoquímica é parte integrante do que se chama de padronização do insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV), juntamente com a caracterização botânica e farmacológica da espécie vegetal. A partir da análise fitoquímica, foi possível identificar classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presentes nos extratos de *Ximenia americana* L (ameixa), *Schinopsis brasiliensis* Engler (braúna) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (catingueira).

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que a folha da ameixa é a planta que possui um maior teor de metabólitos secundários vinculado a concentração de etanol a 90% (v/v) e a ultrassom como método de extração, obteve-se um valor ótimo para polifenóis totais de 461,31 mg de ácido gálico/g de extrato e para taninos condensados de 231,55 mg de catequina/g de extrato, enquanto a folha da braúna, com a concentração de etanol a 90% (v/v) e a turbólise como método de extração, foi a planta que mais obteve flavonoides totais, com um valor máximo 54,66 mg de quercetina/g de extrato.

No planejamento experimental quadrado latino, todas as variáveis independentes influenciaram na determinação de polifenóis totais, enquanto para os flavonoides totais e taninos condensados, apenas os tipos de plantas foram fatores influenciáveis, de acordo com a Análise de Variância. As médias marginais exibem quais os fatores que podem ser utilizados para otimização do experimento: na determinação de flavonoides e taninos pode ser escolhido o método extrativo mais viável e a menor concentração de etanol, devido às suas baixas influências no modelo, resultando em uma análise simples e de baixo custo.

## REFERÊNCIAS

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ANJOS, A. D. Curso Planejamento de Experimentos I. Notas de Aula. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ARCHELA, E.; ANTONIA, L. H. D. Determinação de compostos fenólicos em vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e a Defesa do Organismo. **Química Nova**, v.29, p. 113-123, 2006.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.
- BERG, J.M.T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.
- BESSA, N. G. F. *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. p. 34, 2014. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf)>. Acesso em: 11/05/2018.
- BRASILEIRO, M. T., EGITO, A. A., LIMA, J. R., RANDAU, K. P., PEREIRA, G. C., & ROLIM NETO, P. J. *Ximenia americana* L.: botany, chemistry and pharmacology in the pharmaceutical technology interest. **Braz J Pharm**, v. 89, p. 164-7, 2008.
- CALADO, Verônica. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Editora E-papers, 2003.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, 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. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 3583, 2004.

CHAVES, E. M. F., CHAVES, E. D. B. F., Coelho-de-Souza, G., Figueiredo, L. S., de Barros, R. F. M., & Kubo, R. Um olhar sobre *Ximenia americana* L. e suas potencialidades. **Acta Tecnológica**, v. 9(1), p. 70-77, 2014.

CHAVES, T. P. Estudo químico-farmacológico do extrato seco de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz. 2016. 172f. Tese (Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

CHOUDHARY, N.; SEKHON, B. S. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Journal of Pharmaceutical Education and Research, Ludhiana**, v. 2, n. 2, p. 55, 2011.

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida globrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

CUNICO, M. M. *et al.* Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: EUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 17., CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 2., São paulo. Resumos expandidos. São Paulo: Instituto Biológico, 2004.

DANTAS, B. F., SOARES, F. D. J., LÚCIO, A. A., & ARAGÃO, C. A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

DOE, Planejamento de Experimentos. 2014. Disponível em: <<http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-DOE>>. Acesso em: 11/05/2018.

EMBRAPA. **1º Workshop de Aplicações de Espectroscopia NIR e Quimiometria em Análise de Solos**. 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1048188/1/WorkshopespectroscopiaNIR.pdf>>. Acesso em: 10/05/2018.

FERNANDES, F. H. A. Desenvolvimento de forma sólida obtida a partir de extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler. 2014. 118f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas - PPGCF) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

GOMEZ, K.A. e GOMEZ, A.A. Statistical procedures for agricultural research (2 ed). John wiley and sons, **NewYork**, 680p, 1984.

KENNEDY, David O.; WIGHTMAN, Emma L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531p.

LIMA, C. R. D., Bruno, R. D. L. A., Silva, K. D. R. G. D., Pacheco, M. V., & Alves, E. U. Physiological quality of seeds from different parent trees of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 45, n. 2, p. 370-378, 2014.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. **American Journal Clinical Nutrition.**, n.79, p.727-747, 2004.

MEAD, R. The design of experiments: statistical principles for practical applications. **Cambridge: University Press**, 1988. 618p.

MEDA, Aline; LAMIEN, Charles Eulogie; ROMITO, Marco; MILLOGO, Jeanne; NACOULMA, Odile Germaine. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MONTEIRO, J. M. LINS NETO, E.M.F. AMORIM, E.L.C. STRATTMANN, R.C. ARAÚJO, E.L. ALBUQUERQUE, U.P. Tannin concentration in three sympatric medicinal plants from caatinga vegetation. **Rev Árvore**, v. 29, p. 999–1005, 2005.

MOREIRA, B. O. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl (Anacardiaceae). Dissertação Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. 2016.

NOGUEIRA, Maria Cristina Stolf; CORRENTE, José Eduardo; PIEDADE, S. M. S. Quadrados latinos obtidos por meio de técnicas de confundimento em ensaios fatoriais. **Sci Agric**, v. 57, p. 421-424, 2000.

NOZELLA, E. F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2001.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 14, n. 2, p. 198, 2003.

PEREIRA JÚNIOR, L. R.; ANDRADE, A. P.; ARAUJO, K. D.; BARBOSA, A. S.; BARBOSA, F. M. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. *Floresta e Ambiente, Seropédica*, v. 21, n. 4, 2014.

RAJBHAR, K.; DAWDA, H.; MUKUNDAN, U. Polyphenols: Methods Of Extraction. **Sci Revs Chem Commun**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2015.

SÁ, R.A.; BIEBER, L. W. Constituintes químicos da madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra Fungos, Bactérias e Insetos. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SANTANA, C. P. de. Desenvolvimento de comprimidos com atividade antimicrobiana a partir de extrato de *Ximenia americana* L. 2016. 89f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

SANTOS, R.L. Desenvolvimento de um dentrificio a partir do extrato nebulizador da *Schinopsis brasiliensis* Engler. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba. 2013. 147 p.

SERAPHIN, J. C. Princípios sobre Delineamentos em experimentação agrícola. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás. 1996.

SILVA, C. H. T. P. da. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de *Sapium glandulosum* (L.) Morong e *Caesalpinia pyramidalis* Tul.



visando o desenvolvimento de um gel odontológico. Recife, 2012. 99 f. Tese (doutorado) - UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

SILVA, C. M. A. da. Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, M.S.P. Ensaio pré-clínicos com extratos de plantas medicinais do Semi-Árido Nordeste: contribuição para o tratamento de infecções da cavidade bucal. Dissertação Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011, 81 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SIMÕES, O. M. C. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, p. 14-15.

SOUSA, É. B., WANDERLEY, P. A., WANDERLEY, R. D. O. S., ANDRADE, J. A. M. D., SILVA, É. R. D., & OLIVEIRA, M. E. D. S. Caracterização físico-química do fruto de ameixa selvagem (*Ximenia americana* L.). **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.

SOUZA, P. H. S. de. Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos. 2015. 132p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGO) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

SUSHMA, G.; DEBNATH, S.; KUMAR, C. S.; CHANDU, A. N. Quality and regulatory affairs of herbal drugs: A world-wide Review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 5, p. 389-396, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre, Artmed, 2004.

UCHÔA, V. T., SOUSA, C. M. M., CARVALHO, A. A., Sant'Ana, A. E. G., & Chaves, M. H. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6 (02), p. 091-096, February, 2016.

VASHIST, H., & JINDAL, A. Antimicrobial activities of medicinal plants– review.  
**International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3(1), p.  
222–230, 2012.