

Juvenal Henrique Veloso

**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA VERDE E SUSTENTÁVEL
APLICADA AO ESTUDO DE *BYRSONIMA INTERMEDIA* E
TERMINALIA CATAPPA: DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS E
MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof^o Dr. Daniel Rinaldo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lourdes Campaner
dos Santos

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

V432c Veloso, Juvenal Henrique
Cromatografia líquida verde e sustentável aplicada ao estudo de *Byrsonima intermedia* e *Terminalia catappa*: desenvolvimento de estratégias e métodos de investigação / Juvenal Henrique Veloso. – Araraquara : [s.n.], 2018
96 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Daniel Rinaldo
Coorientador: Lourdes Campaner Dos Santos

1. Murici. 2. Castanhola. 3. Química verde. 4. Quimiometria.
5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Cromatografia líquida verde e sustentável aplicada ao estudo de *Byrsonima intermedia* e *Terminalia catappa*: desenvolvimento de estratégias e métodos de investigação"

AUTOR: JUVENAL HENRIQUE VELOSO

ORIENTADOR: DANIEL RINALDO

COORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



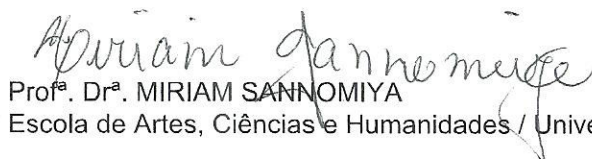
Prof. Dr. DANIEL RINALDO

Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru



Prof.^a. Dr.^a. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a. Dr.^a. MIRIAM SANNOMIYA

Escola de Artes, Ciências e Humanidades / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

Araraquara, 13 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juvenal Henrique Veloso

Nome em citações bibliográficas: VELOSO, J. H.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Prof. Francisco Degni, 55

Bairro: Quitandinha

CEP: 14800-060

Araraquara – SP.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso de Fundamentos de Cromatografia Líquida Aplicada à Indústria Farmacêutica.

Período: abril a maio de 2016 (32 h)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

VELOSO, J. H.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; SANTOS, L. C.; RINALDO, D. et al. Chemometrics as a tool for identification of effective factors in separation of secondary metabolites of *Byrsonima intermedia* extract by HPLC, using Green Chemistry concepts. In: PROCEEDINGS OF BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS AND ANNUAL MEETING ON MICROMOLECULAR EVOLUTION, SYSTEMATICS AND ECOLOGY, 2017, . **Resumos...** Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/bcnp/trabalhos/chemometrics-as-a-tool-for-identification-of-effective-factors-in-separation-of-secondary?lang=en>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

VELOSO, J. H.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; SANTOS, L. C.; RINALDO, D. Fatores efetivos na separação de metabólitos secundários do extrato polar de *Byrsonima intermedia* por CLAE, utilizando conceitos de química verde. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 13., 2017, Araraquara. **Resumos...** São Paulo: UNESP, 2017, p. 88.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

6th Brazilian Conference On Natural Products [BCNP]

XIII Jornada paulista de plantas medicinais [JPPM]

Dedico este trabalho a meu pai Waldyr (*in memoriam*) e a minha mãe Maria, por todo suporte e conselhos valiosíssimos durante minha trajetória até o presente momento. Sem sua ajuda e exemplo não seria quem sou hoje.

Agradeço a Deus por me conceder a força de vontade e conhecimento necessário para chegar até aqui.

Agradeço à minha noiva Gabriela, que em todo o momento esteve ao meu lado, ajudando, apoiando mesmo nos momentos mais difíceis, suportando o estresse, e ajudando a acalmar os momentos mais turbulentos.

E ao meu orientador Daniel Rinaldo, que apesar das minhas muitas falhas durante a execução do projeto, sempre me auxiliou e teve paciência com seu orientando.

O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.

Winston Churchill

RESUMO

As espécies *Byrsonima intermedia* (“murici-mirim”) e *Terminalia catappa* (“castanholas”) apresentam comprovadamente atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antiulcerogênica, analgésica e cicatrizante e possuem em sua composição taninos, flavonóides e ácidos fenólicos. Essas espécies são potenciais candidatas para a produção de fitoterápicos e dessa forma são necessárias metodologias de análise que identifiquem a constituição química dessas espécies, como impressões digitais (*fingerprintings*), para comprovação da identidade e controle de qualidade utilizando, por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Apesar da importância atribuída a essa técnica, grandes volumes de solventes tóxicos são gerados por ano, como a acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH), aumentando os custos de tratamento desses resíduos além da sua manipulação poder ocasionar danos à saúde dos analistas. Uma alternativa eficiente de reduzir esses impactos é a aplicação dos conceitos da Química Verde (QV). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi substituir o MeOH por etanol (EtOH) em análises por CLAE-DAD para a obtenção de *fingerprintings* de extratos hidroalcoólicos das folhas de *B. Intermedia* e *T. catappa*, utilizando uma abordagem multiparamétrica, aplicando os conceitos da QV. Para isso foi empregada a quimiometria nas análises por CLAE-DAD, utilizando Planejamento Fatorial Fracionário e Planejamento do Composto Central. Após a otimização do modelo foram identificadas as substâncias majoritárias de ambas as espécies por comparação dos espectros UV e tempo de retenção com padrões autênticos. Este trabalho demonstrou que foi possível a substituição da MeOH por EtOH sem necessidade de modificações no equipamento, apenas alterando o solvente a partir de condições otimizadas, visando o melhor desempenho e menor impacto ambiental do método. Os métodos verdes desenvolvidos foram comparados com os métodos da literatura pela métrica HPLC-EAT a fim de avaliar o impacto ambiental gerado e quanto maior o *score* obtido pela métrica, mais poluente é o método. Os métodos desenvolvidos obtiveram *score* entre 27 e 30, enquanto que os métodos da literatura obtiveram *score* entre 47 e 50. Além de apresentar menor impacto ambiental, a utilização do EtOH em análises de matrizes complexas, demonstrou seletividade semelhante ou superior à do MeOH, permitindo a identificação dos constituintes presentes nos extratos, sendo então uma opção menos tóxica e sustentável.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia*, *Terminalia catappa*, cromatografia líquida, química verde, cromatografia verde, quimiometria, planejamento fatorial, fingerprint.

ABSTRACT

The species *Byrsonima intermedia* ("murici-mirim") and *Terminalia catappa* ("castanets") have shown antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcerogenic, analgesic and cicatrizant activities and have tannins, flavonoids and phenolic acids in their composition. These species are potential candidates for the production of phytotherapics, and therefore, analytical methodologies are needed to identify the chemical constitution of these species, such as fingerprintings, for proving identity and quality control using, for example, High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Despite the importance attached to this technique, large volumes of solvents are generated per year, such as the toxic solvent, acetonitrile, increasing the costs of treatment of the waste generated and its handling can cause damages to health and the environment, and an efficient way to reduce these impacts is the application of the concepts of Green Chemistry. Despite the importance attached to this technique, large volumes of toxic solvents are generated per year, such as acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH), increasing the costs of treatment of these wastes and their manipulation may cause damage to the health of analysts. An efficient alteration to reduce these impacts is the application of the concepts of Green Chemistry (GC). In this context, the objective of this work was to replace the MeOH by ethanol (EtOH) in CLAE-DAD analyzes to obtain fingerprintings of hydroalcoholic extracts from the leaves of *B. intermedia* and *T. catappa*, using a multiparametric approach, applying the concepts of GC. For this, the chemometry was used in the analyzes by HPLC-DAD, using Fractional Factorial Design and Central Compound Design. After the optimization of the model the major substances of both species were identified by comparison of UV spectra and retention time with authentic standards. This work demonstrated that it was possible to replace the MeOH with EtOH without modifications in the equipment, only changing the solvent from optimized conditions, aiming at the best performance and lower environmental impact of the method. The methods developed obtained a score between 27 and 30, whereas the literature methods obtained a score between 47 and 50. In addition to having a lower environmental impact, the use of EtOH in complex matrix analyzes showed similar or higher selectivity than MeOH, allowing the identification of the constituents present in the extracts, being a less toxic and sustainable option.

Key words: *Byrsonima intermedia*, *Terminalia catappa*, liquid chromatography, green chemistry, green chromatography, quimometry, factorial planning, fingerprint.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Folhas e flores da *Byrsonima intermedia* 17
- Figura 2 - Arvore da espécie *Terminalia catappa* 18
- Figura 3 - Cromatograma da fr. 9:1 do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 254 nm 35
- Figura 4 - Cromatograma da fr. 1:1 do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré coluna C18 (2x7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 254 nm 36
- Figura 5 - Cromatograma da fr. 100 % EtOH do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 254 nm 37
- Figura 6 - Cromatograma da fr. 7:3 do segundo método de clean-up avaliado para o EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 254 nm 38

Figura 7 - Cromatograma da fr. 3:7 (segundo método) do clean-up avaliado para o EHA das folhas de <i>B. intermedia</i> [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); pré coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H ₂ O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ = 254 nm	39
Figura 8 - Cromatogramas da triagem de variáveis de <i>B. Intermedia</i> dos experimentos 1 a 10	42
Figura 9 - Cromatogramas da triagem de variáveis de <i>B. Intermedia</i> dos experimentos 11 a 20	43
Figura 10 - Gráfico dos valores dos efeitos calculados para: resposta N ^o de bandas cromatográficas (Picos), GCFR (x=1), GCFR (x=2)	46
Figura 11 - Cromatogramas do planejamento do composto central, experimentos de 1 a 10	50
Figura 12 - Cromatogramas do planejamento do composto central, experimentos de 11 a 18	52
Figura 13 - Perfil cromatográfico ótimo do EHA das folhas de <i>B. intermedia</i>	54
Figura 14 - Gráficos com base no GCFR (x=2) (a: condição 1 e 2) e (b: número de bandas cromatográficas)	55
Figura 15 - Perfis cromatográficos dos experimentos otimizados	56

- Figura 16 - Cromatogramas das frações do *clean-up* avaliado para o EHA das folhas de *T. catappa* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm); pré coluna C₁₈ (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 254 nm 58
- Figura 17 - Cromatogramas da triagem de variáveis de *T. catappa* dos experimentos 1 a 10 60
- Figura 18 - Cromatogramas da triagem de variáveis de *T. catappa* dos experimentos 11 a 20 62
- Figura 19 - Gráfico dos valores dos efeitos calculados para a resposta N° de bandas cromatográficas (picos), GCFR (x=2) e GCFR (x=1) 64
- Figura 20 - Cromatogramas do planejamento do composto central 66
- Figura 21 - Gráfico com base no GCFR (x=2), GCFR (x=1) e número de bandas cromatográficas 70
- Figura 22 - Cromatogramas das condições determinadas pelas superfícies de resposta 72
- Figura 23 - Perfil cromatográfico de referência da espécie *B. Intermedia* (SANTOS et al., 2012). Identificação das bandas cromatográficas: **(1)** ácido gálico, **(2)** ácido 3,4-di-O-galoilquinico, **(3)** galato de metila, **(4)** catequina, **(5)** epicatequina, **(6)** ácido 1,3,5-tri-O-galoilquinico, **(7)** ácido 1,3,4,5-tetra-O-galoilquinico, **(8)** quercetina-3-O-b-galactopiranosideo, **(9)** quercetina-3-(2''-O-galoil)-O-b-galactopiranoside, **(10)** quercetina-3-O-a-arabinopiranosideo e **(11)** quercetina-3-O-(2'' -O-galoil)-a-arabinopiranosideo 78
- Figura 24 - Método desenvolvido para a espécie *B. Intermedia* e os espectros no UV das principais bandas cromatográficas. 79

Figura 25 - Estruturas das substâncias identificadas no perfil cromatográfico verde de *B. Intermedia* 80

Figura 26 - Perfil cromatográfico de referência da espécie *T. catappa* (MININEL et al., 2014a; 2014b). Identificação das bandas cromatográficas: **(1 e 2)** anômeros α e β da punicalina, **(3 e 4)** anômeros α e β da punicalagina e **(5)** ácido elágico 83

Figura 27 - Perfil cromatográfico verde desenvolvido para *T. catappa* e espectros UV das principais bandas cromatográficas 84

Figura 28 - Estruturas das substâncias identificadas no perfil cromatográfico verde de *T. catappa*. 84

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros ChromNAV	30
Tabela 2 - Variáveis (parâmetros cromatográficos) e níveis estabelecidos na triagem para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>B. Intermedia</i>	31
Tabela 3 - Variáveis (parâmetros cromatográficos) e níveis estabelecidos na triagem para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>T. catappa</i>	31
Tabela 4 - Planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) para avaliação dos efeitos dos parâmetros cromatográficos das análises de <i>B. intermedia</i> e <i>T. catappa</i> por CLAE	32
Tabela 5 - Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos para o Planejamento do Composto Central para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>B. intermedia</i>	33
Tabela 6 - Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos para o Planejamento do Composto Central para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>T. catappa</i> .	33
Tabela 7 - Condições para os experimentos do planejamento do composto central das folhas de <i>B. intermedia</i>	33
Tabela 8 - Condições para os experimentos do planejamento do composto central das folhas de <i>T. catappa</i>	34
Tabela 9 - Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento fatorial fracionário de .. dois níveis e cinco fatores (2^{5-1}) do EHA das folhas de <i>B. intermedia</i>	41
Tabela 10 - Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento do composto central do EHA das folhas de <i>B. intermedia</i>	48
Tabela 11 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR ($\alpha=2$)	49
Tabela 12 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR ($\alpha=1$)	49
Tabela 13 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para nº de bandas cromatográficas	49
Tabela 14 - Condições otimizadas calculadas	55
Tabela 15 - Experimentos baseados nos gráficos de superfície de resposta	56
Tabela 16 - Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento fatorial fracionário de dois níveis e cinco fatores (2^{5-1}) do EHA das folhas de <i>T. catappa</i>	59
Tabela 17 - Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento do composto central do EHA das folhas de <i>T. catappa</i>	65

Tabela 18 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR ($\alpha=2$)	68
Tabela 19 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR ($\alpha=1$)	68
Tabela 20 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para nº de bandas cromatográficas	68
Tabela 21 - Condições obtidas a partir das superfícies de resposta	71
Tabela 22 - Experimentos baseados nos gráficos de superfície de resposta	71
Tabela 23 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental	74
Tabela 24 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental	75
Tabela 25 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 1)	76
Tabela 26 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 2)	76
Tabela 27 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 3)	76
Tabela 28 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 1)	77
Tabela 29 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 2)	77
Tabela 30 - Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 3)	77
Tabela 31 - Comparação entre os valores obtidos pela função HPLC-EAT dos métodos desenvolvidos e dos métodos de referência de <i>B. intermedia</i> e <i>T. catappa</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH	Ácido acético
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de fotoDiodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAT	<i>Environmental Assessment Tool</i>
EHA	Extrato Hidroalcolico
EtOH	Etanol
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprint Response</i>
GL	Graus de Liberdade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MeCN	Cianeto de metila ou acetonitrila
MeOH	Metanol
PTFE	Politetrafluoroetileno
QAV	Química Analítica Verde
QV	Química Verde
SQ	Soma quadrática
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Ácido Tetrahidrofurano
T_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda
μV	10^{-6} unidades de Intensidade em Volts

Sumário

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	OBJETIVO	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Reagentes utilizados	27
3.2	Equipamentos	27
3.3	Preparação do extrato de <i>B. Intermedia</i> e <i>T. catappa</i>	28
3.4	Preparo de amostras (clean-up) dos extratos hidroalcoólicos de <i>B. Intermedia</i> e <i>T. catappa</i>	28
3.5	Análises por CLAE para avaliação dos preparos de amostra	30
3.6	Análise de precisão dos métodos desenvolvidos	30
3.7	Técnicas de planejamento e análise de experimento	31
3.7.1	Planejamento Fatorial Fracionário	31
3.7.2	Planejamento do Composto Central	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1	Desenvolvimento de método verde para análise de <i>B. Intermedia</i>	34
4.1.1	Avaliação do preparo de amostras (clean-up) das folhas de <i>B. Intermedia</i>	34
4.1.2	Triagem de variáveis de <i>B. Intermedia</i>	39
4.1.3	Planejamento do Composto Central (PCC) do EHA das folhas de <i>B. Intermedia</i>	48
4.2	Desenvolvimento de método verde para análise de <i>T. catappa</i>	57
4.2.1	Avaliação do preparo de amostras (clean-up) das folhas de <i>T. catappa</i> por CLAE-DAD	57
4.2.2	Triagem das variáveis de <i>T. catappa</i>	58
4.2.3	Planejamento do Composto Central (CCD) do EHA das folhas de <i>T. catappa</i>	65
4.3	Análise de precisão dos métodos desenvolvidos	73
4.4	Comparativo entre os métodos de referência e os novos métodos desenvolvidos para obtenção dos perfis cromatográficos das espécies estudadas	78
4.4.1	<i>B. Intermedia</i>	78
4.1.2	<i>T. catappa</i>	82
4.5	Aplicação da métrica HPLC-EAT	85
5	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Plantas com princípios bioativos são aquelas que possuem alguma ação sobre outros seres vivos e seu efeito pode se manifestar tanto pela sua presença em um ambiente quanto pelo uso direto de substâncias delas extraídas. Dentro deste conceito, enquadram-se as plantas medicinais, aromáticas, condimentares, inseticidas, repelentes, tóxicas, entre outras (MOREIRA, 2010).

A utilização de plantas como fonte de substâncias terapêuticas se deu de forma empírica pela população, principalmente pelo povo do campo. Essa utilização mais simplória pela população caracterizou, no ponto de vista tecnológico de fármacos sintéticos, como um atraso tecnológico, o qual era tratado também como curandeirismo, acarretando um certo descaso ao se falar em fitoterápicos (GURIB-FAKIM, 2006).

Porém, com o passar do tempo, e com a maior procura por substâncias com propriedades bioativas, a fim de diminuir os gastos com a síntese de novos fármacos, a terapêutica vegetal ganhou muita atenção no meio científico, o que acarretou um maior fomento para o segmento, já que estudo químico, farmacológico, toxicológico e clínico das plantas se faz necessário para referenciá-las quanto a sua eficácia e as possíveis contraindicações ou efeitos adversos (GURIB-FAKIM, 2006).

Nesse sentido, uma espécie que vem se destacando é a *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Figura 1), encontrada no cerrado, conhecida popularmente como “murici-mirim” (do Tupi Guarani que quer dizer: árvore pequena). Na natureza se apresenta na forma de um arbusto com no máximo 1,60 m de altura, com copa desuniforme e caule de cor castanho acinzentado (OLIVEIRA et al.; 2007). Suas folhas são simples, coriáceas, glabras na face superior e pubescentes na face inferior e com ápice ou ponta lanceolada (FERRI, 1969). Suas flores são bem vistosas e amarelas, mas adquirem coloração alaranjada quando velhas. São cíclicas, formando cachos de 10 a 15 cm, em número de 15 a 35 flores dispostas em pequenos racemos (JOLY, 1977). Seu florescimento ocorre entre os meses de outubro a dezembro (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Figura 1. Folhas e flores da *Byrsonima intermedia*.



Fonte: Ricardo Cardim

É uma espécie frutífera, onde seus frutos apresentam dimensões de 7,70 -11,00 cm × 7,77- 10,78 cm, com massa da matéria fresca de 0,29 – 0,71 g de sabor adocicado e suculentos (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

O gênero *Byrsonima* apresenta baixa taxa de germinação, a emergência lenta das plântulas e dormência tegumentar das sementes, o que dificulta seu cultivo, porém são plantas de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em solos areno-argilosos, com clima quente e boa ventilação (PIMENTEL GOMES, 2005; PINTO; BERTOLUCCI, 2002; MONTEIRO, ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). Esse gênero pertence à família *Malpighiaceae* que compreende aproximadamente cerca de 60 gêneros e 1.200 espécies com 50% sendo encontradas no Brasil (AGUIAR et al., 2005; JOLY, 1977).

O uso tradicional do murici-mirim (*B. intermedia*) é pelo consumo do chá da casca do caule e folhas como antisséptico, antimicrobiana, anti-hemorrágica, cicatrizante, antiulcerogênica, anti-inflamatório, antifebrífugo, adstringente e no tratamento de diarreia, disenteria e infecções cutâneas (PINTO; BERTOLUCCI, 2002; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Estudos farmacológicos comprovaram atividades antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, ação antiulcerogênica, atividade analgésica e efeito cicatrizante e relatado pequeno efeito mutagênico (CARVALHO, 2010; MICHELIN et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2007; SANTOS et al., 2006, 2007).

Estudos da química de *B. intermedia* relatam a presença de catequinas, derivados de quercetina, ácido gálico e galato de metila em suas raízes (SANNOMIYA et al., 2004).

Foi evidenciado também a presença de pirogálico, pirocatequinas e β -amirina em suas raízes (BONZANI DA SILVA, 1970a e 1970b). E lupeol e β -amirina nas folhas secas (FELÍCIO et al., 1995), e seu óleo floral é rico em ácidos graxos livres e o principal constituinte identificado foi o ácido birsônico (REIS et al., 2007).

Outra espécie que se destaca como medicinal é a *Terminalia catappa* (Figura 2), conhecida popularmente como castanhola, amendoeira, chapéu-de-sol, guarda-chuva, chapéu-de-praia, amêndoa-da-índia, amendoeira-do-pará, árvore-da-noz, sete-copas e noz-da-praia. Se apresenta na natureza como uma árvore de grande porte, medindo de 12 a 15 metros de altura, é uma espécie caducifólia, de tronco ereto, suas folhas são alternas, grandes, agrupadas a espaços ao longo dos ramos e nas extremidades, ovaladas, coriáceas, verdes e marrom-avermelhadas de 12 a 25 centímetros de comprimento. Seus frutos são elipsoides, amarelos-esverdeados ou rosa-arroxeados com pouca polpa. As sementes (amêndoa) são duras, comestíveis, envoltas por uma casca fibrosa que contém um óleo fino (LORENZI, 2003).

Figura 2. Arvore da espécie *Terminalia catappa*.



Fonte: C. Elevitch

O gênero *Terminalia* pertence à família Combretaceae, sendo originária da Malásia, e maior distribuição no continente africano. Não há uma quantidade exata no número de espécies e gêneros pertencentes a essa família, alguns autores citam essa família contendo cerca de 475 espécies e 20 gêneros (MARQUETE; VALENTE, 1997), outros citam cerca de 500 espécies e 14 gêneros, sendo que no Brasil há a ocorrência de 64 espécies (STACE, 2010).

O uso tradicional da *T. catappa* é realizado pela utilização do fruto na produção de xarope (MOREIRA et al., 2002), porém utiliza-se as folhas e caule, dependendo da região onde se encontra, no tratamento de bronquite, problemas nos rins, diarreia, dores na coluna e tratamento para redução de peso (RIBEIRO et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

Estudos farmacológicos comprovaram atividades anticâncer, antioxidante, anti-HIV, ação hepatoprotetora, anti-inflamatório, antidiabético e afrodisíaca (CHEN et al., 2000; LIN et al., 1997, 2000; MASUDA et al., 1999; RATNASOORIYA, 2000; TAN et al., 1991).

Estudos químicos de *T. catappa* relatam a presença de terpenoides como ácido ursólico e ácido 2 α , 3 β , 23-triidroxiurs-12-en-28 óico, ácido gálico, ácido chebulagico, ácido elágico, cianidina-3-glicosídeo, taninos como punicalagina, punicalina, tergalagina, corilagina (elagetanino) e flavonóides como vitexina, isoorientina e rutina (BASNET et al., 1993; FAN et al., 2004; HECHT et al., 1992; KASIWADA et al., 1993; TAN et al., 1991; TEOTIA; SINGH, 1997).

Pelas atividades farmacológicas comprovadas, as espécies citadas possuem potencial para produção de fitoterápicos.

Assim como em medicamentos alopáticos, a produção de fitoterápicos necessita de controles rígidos de qualidade em que a identidade e quantidade dos princípios ativos sejam aquelas que apresentaram as atividades cientificamente comprovadas. Ainda, as plantas possuem dezenas e até centenas de constituintes químicos, sendo consideradas matrizes complexas, além de existirem espécies visualmente parecidas mas com composição química totalmente diferentes e conseqüentemente com atividades diferentes, podendo até apresentarem contrárias (MARQUETE; VALENTE, 1997).

A presença de componentes ativos nos extratos ou fitoterápicos dependem de ações externas, como por exemplo, o ambiente onde se encontra a espécie, o clima, e também ações realizadas para a obtenção dos extratos, como por exemplo a secagem do material, lavagem, pulverização, também os métodos de extração utilizados, o que pode promover a extração de componentes não necessários, e a não extração daqueles mais

importantes. Assim, é possível determinar a identidade de uma espécie vegetal pelo seu *fingerprinting* (FUNARI et al., 2014; STACE, 2010).

Também conhecido como “impressão digital”, o *fingerprinting* é um conceito que envolve a utilização de técnicas ou conjunto de técnicas acopladas (técnicas hífenadas) que permite a identificação rápida de diferentes substâncias ou classes de substâncias que compõem uma amostra. As técnicas utilizadas para a obtenção da “impressão digital” de uma amostra podem ser técnicas espectroscópicas (ultravioleta, fluorescência, infravermelho, ressonância magnética nuclear, etc.) e espectrométricas (espectrometria de massas) acopladas ou às técnicas cromatográficas (cromatografia líquida, gasosa ou supercrítica). Quanto maior o número de técnicas acopladas, maior é a quantidade de informações sobre as substâncias presentes na amostra (FUNARI et. al., 2014).

Segundo Alaerts e colaboradores (2010), a Organização Mundial de Saúde aceita a utilização de *fingerprinting* como forma de avaliação da qualidade e identidade de plantas medicinais desde 1991. Devido à relação custo/benefício a maioria dos laboratórios “comerciais” utiliza a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada, principalmente, ao detector de arranjo de fotodiodos (DAD) para a separação, identificação e quantificação de substâncias no âmbito químico, farmacêutico, entre outros (GABER et al., 2011).

Segundo GABER e col. (2011) estima-se que até o ano de 2011, o número de instrumentos CLAE ao redor do mundo chegou à marca de 130.000 unidades, evidenciando sua importância nas diversas análises de separação e identificação de substâncias.

Na literatura há muitos trabalhos envolvendo o desenvolvimento de métodos para obtenção de *fingerprinting* de espécies vegetais medicinais por cromatografia líquida, o que comprova a popularidade e a importância dessa técnica (ALAERTS et al., 2007; CHEN et al., 2010; FAN et al., 2006; JI et al., 2005; KONG et al., 2009; LI et al., 2007, 2010; LIANG et al., 2010; WEI et al., 2010; XIE et al., 2007; YE et al., 2009).

Porém, a maioria dos métodos cromatográficos desenvolvidos utilizam solventes que, apesar de eficientes no processo de separação, são altamente tóxicos, e a quantidade de resíduos gerados nas análises dessas centenas de milhares de equipamentos podem acarretar sérios danos ao meio ambiente, além de proporcionar ambiente insalubre para os analistas.

Acetonitrila ou o cianeto de metila (MeCN) é o solvente orgânico mais utilizado atualmente em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por causa de suas

características únicas, como a dissolução de uma ampla gama de solutos, baixa acidez, baixa viscosidade, reatividade química mínima, baixa absorvância na região do ultravioleta e compatibilidade com a espectrometria de massas (CASSINI, 2013; LANÇAS, 2009). A obtenção da acetonitrila se dá através da produção de fibras e resinas de acrílico, sendo um subproduto dessa reação. Possui toxicidade aguda, é carcinogênica e prontamente absorvida quando em contato com a pele, espalhando-se por todo o corpo rapidamente; possui moderada temperatura de ebulição (82 °C) e seu vapor pode agredir os pulmões em caso de inalação. A intoxicação por MeCN pode causar graves efeitos sistêmicos, pois o cianeto (produto de degradação da MeCN) é um potente inibidor da cadeia transportadora de elétrons (CASSINI, 2013; SIGMA-ALDRICH, 2011).

O metanol ou álcool metílico (MeOH), segundo solvente orgânico mais utilizado na CLAE, pode causar intoxicação através das vias respiratórias, digestivas e cutâneas, sendo rapidamente absorvido e distribuído por todos os tecidos, e concentrando-se nos tecidos com alto conteúdo hídrico, como por exemplo os fluidos cérebro-espinhal e intraocular. O efeito tóxico do MeOH no homem decorre da combinação entre o sistema nervoso central e a acentuada acidose, provocada pela formação do ácido fórmico e de formaldeídos, os quais são nocivos para células da retina. Quando inalado, promove distúrbios locais como irritação, coceira na pele, dermatite e eczema de pele, dor de cabeça, fadiga, insônia, vertigens, entre outras, podendo chegar a causar cegueira. A exposição crônica de MeOH combinada com a de monóxido de carbono pode levar à arteriosclerose cerebral (CARDOSO, 1995).

O Tetrahidrofurano (THF), o terceiro solvente orgânico mais utilizado na CLAE, possui toxicidade aguda para via oral, dérmica ou por inalação, pode promover danos graves aos olhos, como irritação grave, podendo causar danos irreparáveis. Além disso, o THF causa irritação dérmica, dermatite e edemas em caso de contato prolongado. É classificado como carcinogênico e a exposição repetida a inalação pode causar irritação do trato respiratório, da membrana da mucosa, efeitos no fígado, rins e produzir estado narcótico (CASQUÍMICA, 2011, CETESB, 2016)

Diante dos fatos expostos, pode-se concluir que a utilização de solventes tóxicos na cromatografia líquida principalmente em análises de rotina como controle de qualidade (identificação e quantificação), pode acarretar enormes prejuízos ao meio ambiente e a saúde dos analistas.

Dessa preocupação de preservação ambiental surgiu o conceito de química verde, que segundo a União de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and*

Applied Chemistry - IUPAC) pode ser definida como: “A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” (GABER et al., 2011; TSUKUI; REZENDE, 2014; ZORZANELLI; MURI, 2015).

O conceito de química verde surgiu nos Estados Unidos pela *Environmental Protection Agency* (EPA) em colaboração com a *American Chemical Society* (ACS) e o *Green Chemistry Institute*, com programas que visavam a prevenção e controle de poluentes (TSUKUI; REZENDE, 2014).

Química Verde é definida como o desenho, o desenvolvimento e a implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (ANASTAS; WARNER, 1998; ANASTAS; EGHBALI, 2010; LENARDÃO et al., 2003). Os produtos ou processos da Química Verde podem ser divididos em três grandes categorias: (i) uso de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima; (ii) aumento da eficiência de energia, ou a utilização de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto e (iii) evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Inicialmente, Paul Anastas e John Warner inseriram 12 princípios da Química Verde em 1998, que foram:

- 1.Prevenção da geração de resíduos;
- 2.Economia de átomos;
- 3.Síntese de produtos menos perigosos;
- 4.Planejamento de produtos seguros;
- 5.Evitar o uso de solventes e auxiliares, quando não;
- 6.Busca pela eficiência de energia;
- 7.Uso de fontes renováveis de matéria prima;
- 8.Evitar a formação de derivados;
- 9.Utilização de catalisadores;
- 10.Planejamento para a degradação;
- 11.Análise em tempo real para a prevenção da poluição.
- 12.Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes.

Pragmaticamente, visto que alguns dos conceitos e princípios da Química Verde, conforme idealizados por Anastas e Werner segundo as necessidades da química

sintética, não podem ser diretamente aplicados à Química Analítica, a exemplo da ideia de 'economia de átomos' (princípio 2). Desse modo, esses princípios precisaram ser reformulados e revisados visando uma aplicabilidade mais ampla (TOBISZEWSKI; MECHLIŃSKA; NAMIEŚNIK, 2009, 2010; NAMIEŚNIK, 2000).

Nesse contexto, foram inseridos 12 princípios da Química Analítica Verde (QAV), idealizados por Gałuszka e colaboradores (2013):

1. Técnicas analíticas diretas devem ser utilizadas para evitar tratamento de amostra;
2. O tamanho e quantidade das amostras devem ser os mínimos possíveis;
3. Medições *in situ* são priorizadas;
4. Processos e operações analíticas devem ser integrados;
5. Métodos automatizados e miniaturizados são preferíveis;
6. Deve-se evitar derivação;
7. Geração de uma grande quantidade de resíduos deve ser evitada e um manejo adequado dos mesmos deve ocorrer;
8. Métodos multi-análito ou multiparamétricos são priorizados;
9. O gasto de energia deve ser minimizado;
10. O uso de reagentes oriundos de fontes renováveis é prioritário;
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do analista deve aumentar.

Esses 12 princípios da QAV facilitaram a aplicação dos conceitos da Química Verde na cromatografia líquida e para isso podemos adotar duas estratégias principais: (1) redução do volume desses solventes e (2) substituição por solventes menos tóxicos (GABER et al., 2011; TSUKUI; REZENDE, 2014; ZORZANELLI; MURI, 2015).

A estratégia (1) pode ser alcançada utilizando colunas cromatográficas menores e mais eficientes. Essas colunas acarretam maiores pressões no sistema cromatográfico, podendo ser aplicadas na Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE). A estratégia (2) pode ser atingível pela utilização de solventes menos tóxicos, como o etanol (EtOH).

Embora a estratégia (1) possa diminuir significativamente ou até eliminar, no caso da combinação das estratégias (1) e (2), a utilização de solventes tóxicos, o equipamento necessário para a aplicação CLUE é muito mais custoso que o da CLAE devido aos componentes menores (tubulações, colunas, celas de detectores, etc) e sua capacidade de suportar pressões acima de 400 bar. Esse fato pode impossibilitar a aplicação de métodos menos poluentes por pequenos laboratórios. Com isso, a estratégia (2) aplicada

a CLAE seria mais abrangente e teria maior impacto na redução de resíduos tóxicos gerados (GABER et al., 2011; TSUKUI; REZENDE, 2014; ZORZANELLI; MURI, 2015).

A substituição dos solventes orgânicos tóxicos mais comuns, conforme citado anteriormente, por um menos tóxico como EtOH, por exemplo, não é uma tarefa trivial no desenvolvimento de métodos cromatográficos para a CLAE, devido à diferença de seletividade e maior viscosidade. O grande desafio está em encontrar uma combinação de parâmetros cromatográficos que permita obter separações tão eficiente quanto os métodos que utilizaram os solventes orgânicos tradicionais.

Uma estratégia rápida, racional e eficiente para o desenvolvimento de métodos cromatográficos é a utilização da quimiometria, utilizando uma abordagem multiparamétrica para determinar as condições ótimas dos parâmetros cromatográficos da CLAE. Esse campo específico da química visa o planejamento e otimização de condições experimentais e extrair informações importantes de um conjunto determinado de dados a partir de ferramentas estatísticas, matemáticas e computacionais, garantindo a maximização da confiabilidade e validação de um método analítico (RIBEIRO et al., 2007; TEÓFILO; FERREIRA, 2005).

Pode-se utilizar como artifício para planejamentos experimentais – sejam fatoriais completos ou fracionários – a disposição de dados químicos em planilhas eletrônicas de *softwares* gratuitos ou pagos que facilitam cálculos e manipulações algébricas, processamento e visualização de informações, elaboração de tabelas e plotagem de gráficos. Estas permitem a determinação, por uma triagem, de variáveis (de níveis arbitrários) com efeitos importantes em um sistema químico estudado e a quantificação de sua influência individual ou integrada na resposta desejada através de cálculos matriciais e uso de análise de variância, ou ANOVA, por exemplo. Assim, torna-se possível o entendimento do comportamento do processo/sistema químico, geralmente regido e/ou definido por uma função matemática empírica cuja elucidação possibilita a otimização do sistema e obtenção de um método ótimo de análise a partir da seleção das variáveis mais significativas (RIBEIRO et al., 2007; TEÓFILO; FERREIRA, 2005).

Percebe-se, então, que a utilização da quimiometria no processo de desenvolvimento de métodos cromatográficos para a CLAE possui as premissas da Química Verde, pois é uma estratégia eficiente, rápida e proporciona menor consumo de energia e reagentes.

Com o intuito de desenvolver métodos com solventes sustentáveis, o EtOH seria uma alternativa para a substituição dos solventes tóxicos utilizados comumente na CLAE.

Além de possuir uma produção sustentável, sendo amplamente produzido no Brasil, principalmente no interior do estado de São Paulo, o EtOH é um solvente de baixa toxicidade e biodegradável.

E embora essas espécies, ainda, não estão relacionadas na Rénisus (Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS), *B. intermedia* e *T. catappa* possuem comprovadamente importantes atividades farmacológicas, sendo interessantes candidatas para compor a Rénisus e espécies potenciais para a produção de fitoterápicos.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de análise eficientes, verdes e de menor custo para a obtenção de impressões digitais de extratos das folhas de *B. Intermedia* e *T. catappa* por CLAE-DAD, utilizando uma abordagem multiparamétrica e aplicando os conceitos da Química Verde.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica e Processos da Faculdade de Ciências de Bauru, coordenado pelo Prof. Dr. Daniel Rinaldo, e no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química de Araraquara, coordenado pela Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

3.1 Reagentes utilizados

Solventes grau PA: acetato de etila (Synth®), ácido acético glacial (Synth®) e EtOH (Synth®);

Solventes grau HPLC: EtOH (TEDIA®) e água ultrapurificada tipo III.

Padrões de metabólitos secundários: todos os padrões utilizados para identificação das bandas cromatográficas nos perfis de *B. intermedia* e *T. catappa* foram isolados e identificados, em estudos anteriores, por outros alunos do nosso grupo de pesquisa.

3.2 Equipamentos

Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-DAD) da marca Jasco® equipado com bomba quaternária modelo PU – 2089 Plus, detector DAD modelo MD – 2010 Plus, injetor automático modelo AS – 2055 Plus, coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm) com uma pré coluna da mesma marca e fase estacionária (2 x 7,8 mm). A água ultrapurificada tipo III foi obtida de um ultrapurificador Direct-Q3 UV Smart (Waters®).

A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o *software ChromNAV* (Cromatec®).

3.3 Preparação do extrato de *B. intermedia* e *T. catappa*

As folhas da *T. catappa* foram coletadas na orla da praia da cidade de Santos-SP,, no mês de abril de 2010, identificadas por Paulo Salles Penteado, sendo arquivada e registrada como (M Tomar 01) no Herbarium da Universidade Santa Cecília (HUSC), com autorização do IBAMA sob o nº 33152.

As folhas foram trituradas e armazenadas em recipientes devidamente fechados e ao abrigo da luz. Os materiais triturados foram utilizados para a preparação dos extratos hidroalcoólicos (EHA) na proporção 1:10 (material vegetal/mistura extratora) 10 g de *T. catappa* foram imersos em uma mistura extratora de EtOH/H₂O (7:3, v/v) durante 144 horas. A mistura extratora foi substituída a cada 48 horas.

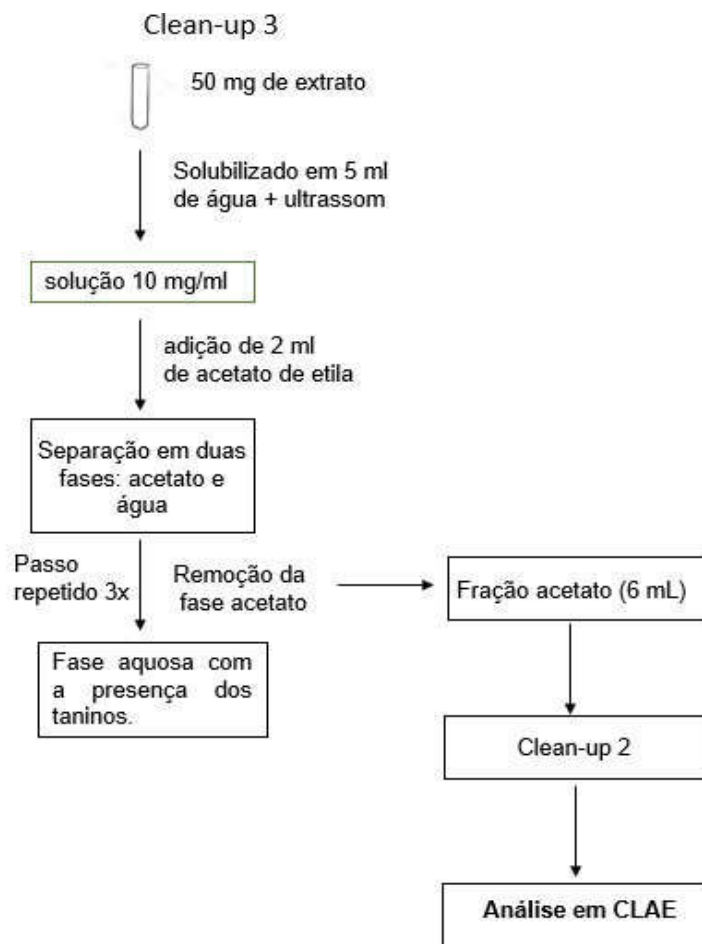
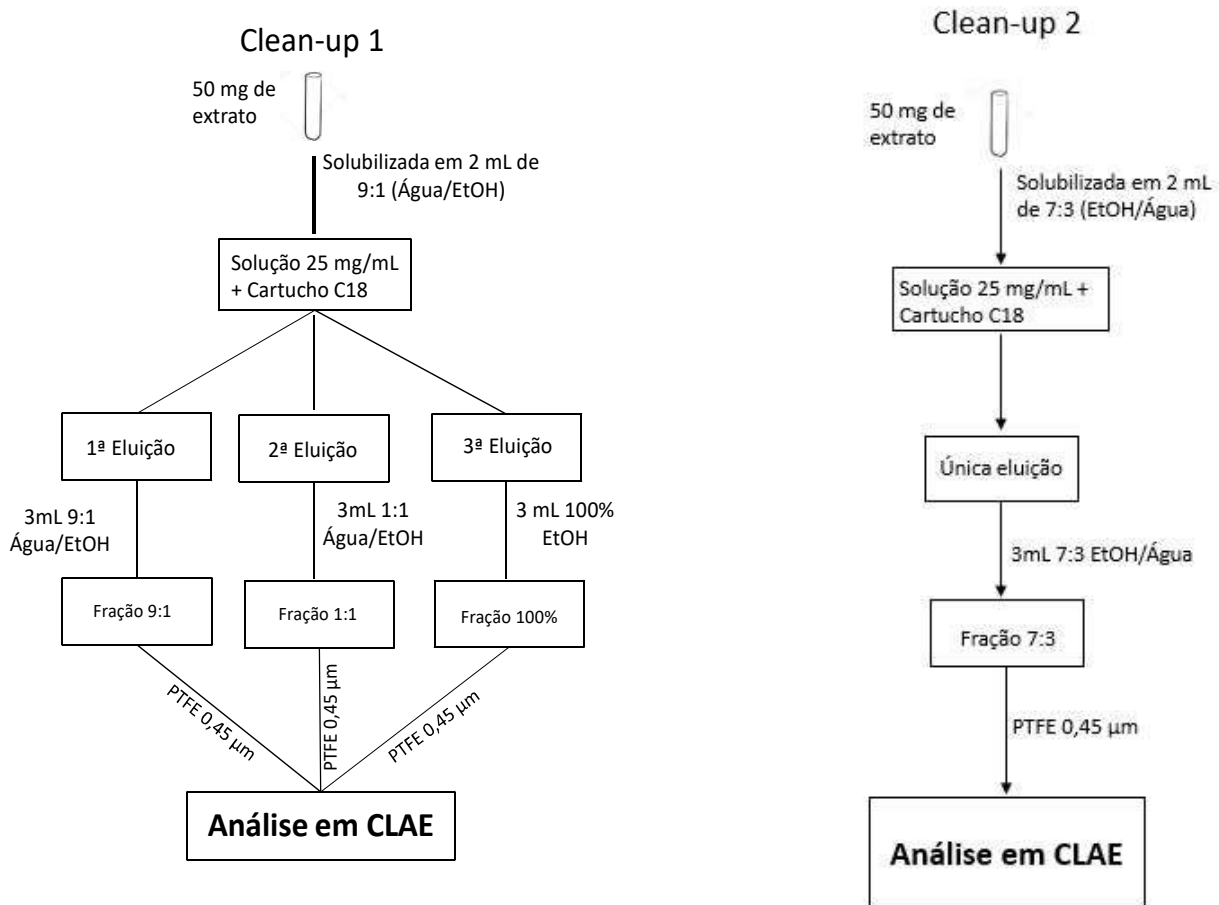
Após a extração, os líquidos extratores foram evaporados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C.

3.4 Preparo de amostras (clean-up) dos extratos hidroalcoólicos de *B. Intermedia* e *T. catappa*

O preparo das amostras para análises por CLAE foram utilizados cartuchos Strata C₁₈ E (6 mL, 500 mg, 55 µm, Phenomnex®) e microfiltros em disco de 0,45 µm de PTFE (Chromafil® Xtra).

Os procedimentos avaliados para o desenvolvimento dos *clean-up* estão ilustrados no esquema 1.

Esquema 1. Procedimentos utilizados para o desenvolvimento dos *clean-up* dos extratos de *B. intermedia* e *T. catappa*.



3.5 Análises por CLAE para avaliação dos preparos de amostra

Nas análises que avaliaram a eficiência dos diferentes preparos de amostra (*clean-up*), o modo de eluição utilizado foi gradiente com a seguinte programação da fase móvel: 95:5 a 0:100 % (H₂O+0,5 % HAc : EtOH, v/v) em 60 minutos com vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de 35 °C.

3.6 Análise de precisão dos métodos desenvolvidos

A análise de precisão dos métodos desenvolvidos foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução da ANVISA (**RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**) e com o guia do ICH (*International Conference on Harmonisation*), em que foram avaliadas a repetibilidade, precisão instrumental e precisão intermediária dos métodos desenvolvidos (ANVISA, 2017; ICH, 2005.).

Para o procedimento de repetibilidade, foram realizados nove experimentos, utilizando as mesmas concentrações para cada fração (aproximadamente 10 mg/mL). Para precisão instrumental e intermediária, foram realizados também nove experimentos, utilizando três concentrações de amostra (aproximadamente 5 mg/mL; 10 mg/mL e 20 mg/mL) como nível baixo, médio e alto, realizando triplicatas para cada concentração, e em dias diferentes. A avaliação da qualidade do método se deu partir do desvio padrão relativo (DPR) utilizando como parâmetros a área total das bandas no cromatogramas e os tempos de retenção das bandas classificadas como padrão interno (maiores intensidade dentro do cromatograma).

A obtenção das áreas relativas de cada banda e dos tempos de retenção foram realizadas pelo *software* ChromNAV. Onde os parâmetros utilizados para essa finalidade foram:

Tabela 1. Parâmetros ChromNAV.

Parâmetro	Valor	Unidade
Sensibilidade de inclinação	10,00	µV/sec
Largura da inclinação	10,000	min
Área mínima	40000	µV*sec
Altura mínima	1000	µV/min

Dessa forma, foi utilizado a área total de bandas cromatográficas para cada experimento e o tempo de retenção das bandas cromatográficas principais (maior intensidade).

3.7 Técnicas de planejamento e análise de experimentos

3.7.1 Planejamento Fatorial Fracionário

A partir dos dados obtidos com o procedimento descrito no item 3.5 foi possível a determinação para os parâmetros aplicados na realização do Planejamento Fatorial Fracionário para ambas as espécies utilizando como variáveis a % inicial de etanol; % final de etanol, temperatura, % ácido acético na água e vazão, conforme Tabelas 2 e 3. Os valores dos níveis de cada variável (parâmetros cromatográficos) foram estipulados com base no tempo de retenção da primeira e última banda cromatográfica presente nos cromatogramas do *clean-up* de ambas as espécies. Utilizando a codificação -1, 0 e +1 compreendendo os níveis: baixo, médio e alto, respectivamente, obtendo as condições para os 20 experimentos gerados para cada espécie (Tabela 4).

Tabela 2. Variáveis (parâmetros cromatográficos) e níveis estabelecidos na triagem para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *B. Intermedia*.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1. % inicial de EtOH	5	6	7
X2. % final de EtOH	40	50	60
X3. Temperatura das análises (°C)	30	45	60
X4. % de AcOH	0,10	0,55	1,00
X5. Vazão (mL.min ⁻¹)	0,60	0,80	1,00

Tabela 3. Variáveis (parâmetros cromatográficos) e níveis estabelecidos na triagem para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *T. catappa*.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1. % inicial de EtOH	5	7,5	10
X2. % final de EtOH	20	25	30
X3. Temperatura das análises (°C)	30	45	60
X4. % de AcOH	0,1	0,55	1,0
X5. Vazão (mL.min ⁻¹)	0,6	0,8	1,0

Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário (2_v^{5-1}) para avaliação dos efeitos dos parâmetros cromatográficos das análises de *B. intermedia* e *T. catappa* por CLAE.

Experimento	X1	X2	X3	X4	X5
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
PC1	0	0	0	0	0
PC2	0	0	0	0	0
PC3	0	0	0	0	0
PC4	0	0	0	0	0

3.7.2 Planejamento do Composto Central

Dado a identificação das variáveis com maior impacto sobre a separação dos metabólitos secundários a partir do planejamento anterior para *B. intermedia* (Tabela 5) e *T. catappa* (Tabela 6), foi realizado o Planejamento do Composto Central, onde foi acrescentado dois pontos axiais codificados como +1,68 e -1,68 para a espécie *B. intermedia* (Tabela 7) e +1,41 e -1,41 para a espécie *T. catappa* (Tabela 8).

O tratamento estatístico e os gráficos de superfície de resposta foram processados utilizando *software* GNU Octave 4.2.1, Design Expert 11 (Stat-Ease©), Excel 2013 (Microsoft, USA).

Tabela 5. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos para o Planejamento do Composto Central para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *B. intermedia*.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X2. % final de EtOH	33	40	50	60	67
X3. Temperatura das análises (°C)	22	30	45	52	60
X5. Vazão (mL.min⁻¹)	0,5	0,6	0,8	1,0	1,1

Tabela 6. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos para o Planejamento do Composto Central para o desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *T. catappa*.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
X2. % final de EtOH	15,90	20,00	30,00	40,00	44,10
X5. Vazão (mL.min⁻¹)	0,44	0,60	1,00	1,40	1,56

Tabela 7. Condições para os experimentos do planejamento do composto central das folhas de *B. intermedia*.

Exp.	X2	X3	X5
1	-1 (40%)	-1 (30°C)	-1 (0,6 mL/min)
2	+1 (60%)	-1 (30°C)	-1 (0,6 mL/min)
3	-1 (40%)	+1 (52°C)	-1 (0,6 mL/min)
4	+1 (60%)	+1 (52°C)	-1 (0,6 mL/min)
5	-1 (40%)	-1 (30°C)	+1 (1,0 mL/min)
6	+1 (60%)	-1 (30°C)	+1 (1,0 mL/min)
7	-1 (40%)	+1 (52°C)	+1 (1,0 mL/min)
8	+1 (60%)	+1 (52°C)	+1 (1,0 mL/min)
9	-1.68 (33%)	0(41°C)	0 (0,8 mL/min)
10	+1.68 (67%)	0 (41°C)	0 (0,8 mL/min)
11	0(50%)	-1.68 (22°C)	0 (0,8 mL/min)
12	0(50%)	+1.68 (60°C)	0 (0,8 mL/min)
13	0(50%)	0(41°C)	-1,68 (0,5 mL/min)
14	0(50%)	0 (41°C)	+1,68 (1,1 mL/min)
PC1	0(50%)	0(41°C)	0 (0,8 mL/min)
PC2	0(50%)	0 (41°C)	0 (0,8 mL/min)
PC3	0(50%)	0(41°C)	0 (0,8 mL/min)
PC4	0(50%)	0 (41°C)	0 (0,8 mL/min)

Nota: X2. % final de EtOH; X3. Temperatura das análises; X5. Vazão.

Tabela 8. Condições para os experimentos do planejamento do composto central das folhas de *T. catappa*

Exp.	X2	X5
1	-1 (20%)	-1 (0,60 ml/min)
2	+1 (40%)	-1 (0,60 ml/min)
3	-1 (20%)	+1 (1,40 ml/min)
4	+1 (40%)	+1 (1,40 ml/min)
5	0 (30%)	0 (1,00 ml/min)
6	0(30%)	0 (1,00 ml/min)
7	0 (30%)	0 (1,00 ml/min)
8	-1,41 (15,90%)	0 (1,00 ml/min)
9	0 (30%)	-1,41(0,44 ml/min)
10	+1,41 (44,10%)	0 (1,00 ml/min)
11	0(30%)	+1.41 (1,56 ml/min)

Nota: X2. %final de EtOH; X5. Vazão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Desenvolvimento de método verde para análise de *B. intermedia*

4.1.1 Avaliação do preparo de amostras (*clean-up*) das folhas de *B. intermedia*

O EHA das folhas de *B. intermedia* foi submetido a dois métodos de *clean-up* com extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos Strata C₁₈ para a remoção de possíveis interferentes que pudessem ficar adsorvidos na coluna de fase reversa do sistema CLAE, prejudicando a eficiência da coluna e reduzindo o seu tempo de vida útil, além de interferir na resposta dos metabólitos secundários de interesse.

Nos testes realizados, buscou-se um procedimento rápido, simples, com a utilização de solventes e reagentes, de baixa ou nenhuma toxicidade, capazes de concentrar o maior número de metabólitos secundários em uma única fração.

Para avaliar a eficiência do *clean-up* foi utilizada a CLAE-DAD cujas condições estão descritas na seção 3.5.

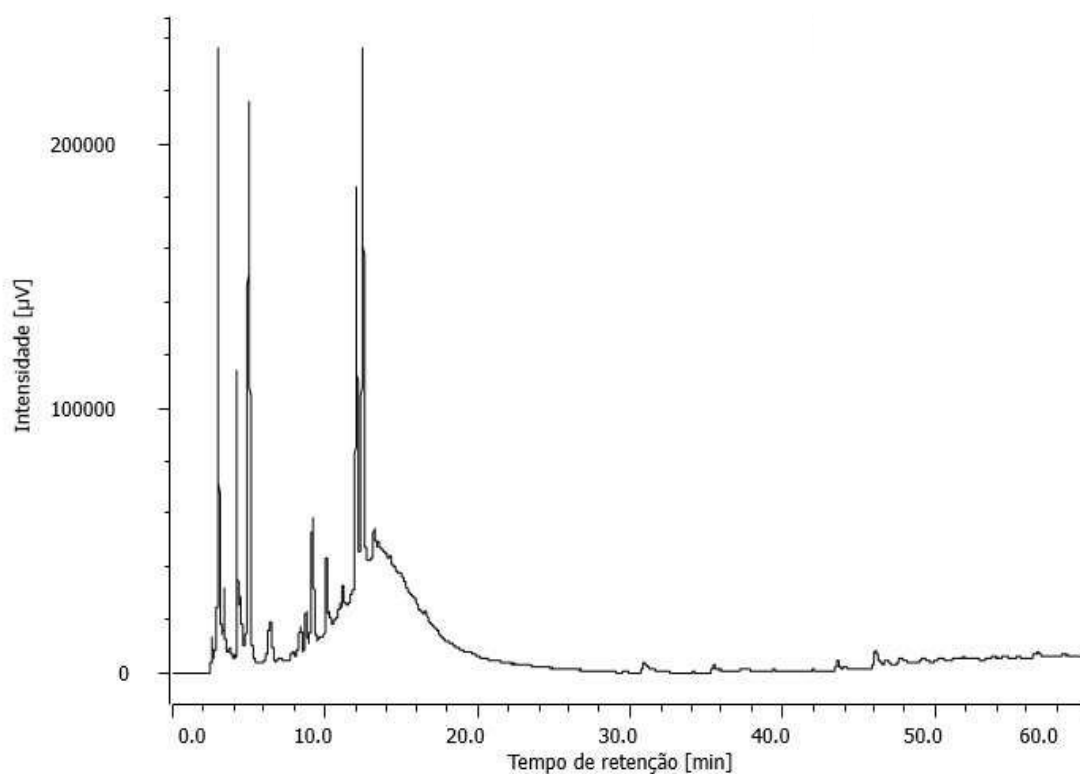
Nas análises por CLAE-DAD, a água da fase móvel foi acidificada com ácido acético a fim de se evitar o encaudamento nas bandas cromatográficas com a supressão de ionização dos metabólitos secundários de caráter ácido presentes no EHA de *B. intermedia*, como: flavonóides e catequinas (LIRA, 2007; MACIEL; PINTO; JUNIOR, 2002). A escolha do ácido acético (AcOH) e do EtOH foi baseada na classificação “verde” nos guias

“ACSGCI – *Green Solvent Selection Guide*” (HENDERSON et al., 2011) e do “Pfizer *Medicinal Chemistry – Solvent Selection Guide*” (ALFONSI et al., 2008).

A primeira avaliação foi realizada com o fracionamento do EHA de *B. Intermedia* ilustrado no Esquema 1 como “*clean-up 1*”.

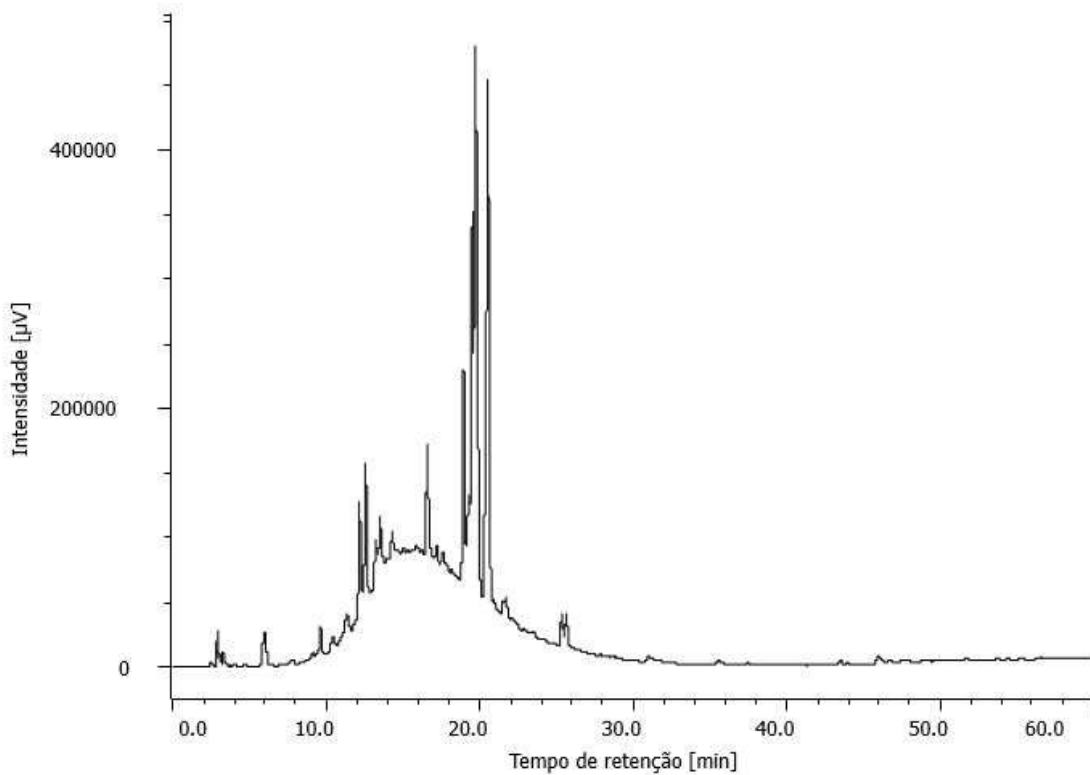
No cromatograma da fração (fr.) 9:1 é possível observar a presença de bandas de maior intensidade com baixo tempo de retenção, que sugere a presença de substâncias com polaridade elevada (menor interação com a fase estacionária).

Figura 3. Cromatograma da fr. 9:1 do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ =254 nm.



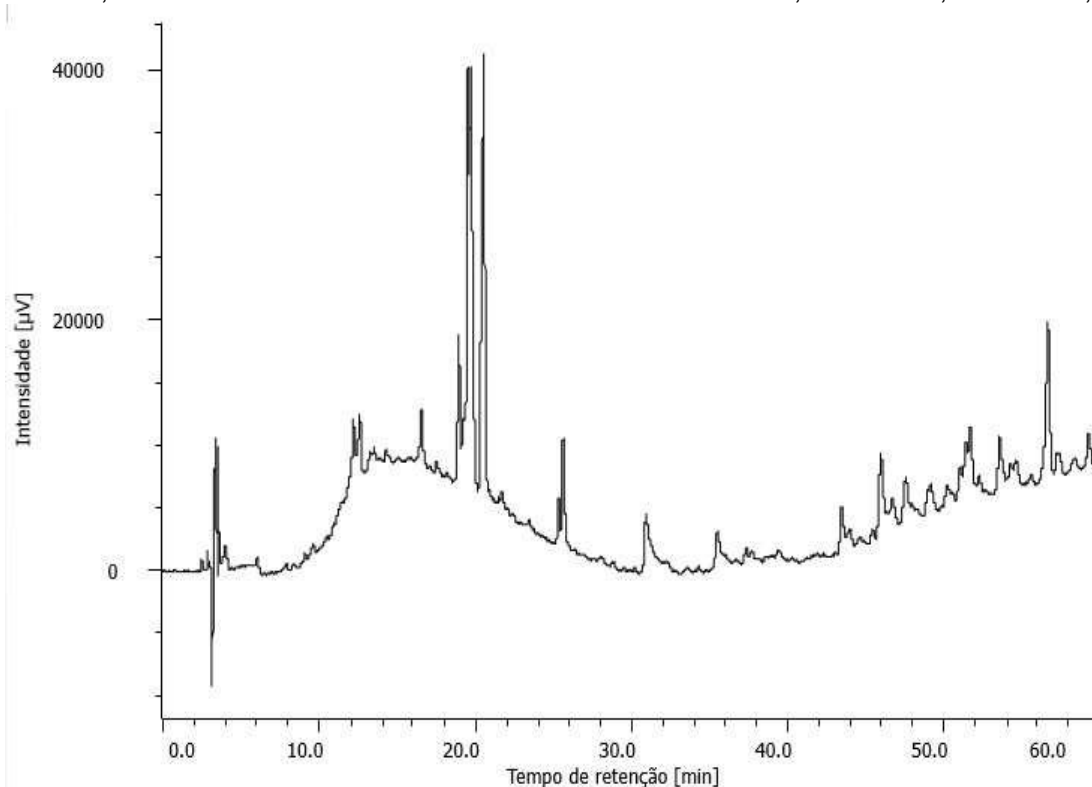
No cromatograma da fr.1:1 (Figura 4) é possível observar a presença de bandas com tempos de retenção médios, caracterizando a presença de substâncias de média polaridade.

Figura 4. Cromatograma da fr. 1:1 do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), pré coluna C18 (2x7,8 mm); Solvente A: H_2O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min^{-1} ; $\lambda=254$ nm.



No cromatograma da fr. 100% EtOH (Figura 5) é possível observar que as bandas cromatográficas presentes possuem baixa intensidade, podendo estar relacionada com baixa concentração na fração.

Figura 5. Cromatograma da fr. 100% EtOH do clean-up do EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ =254 nm.

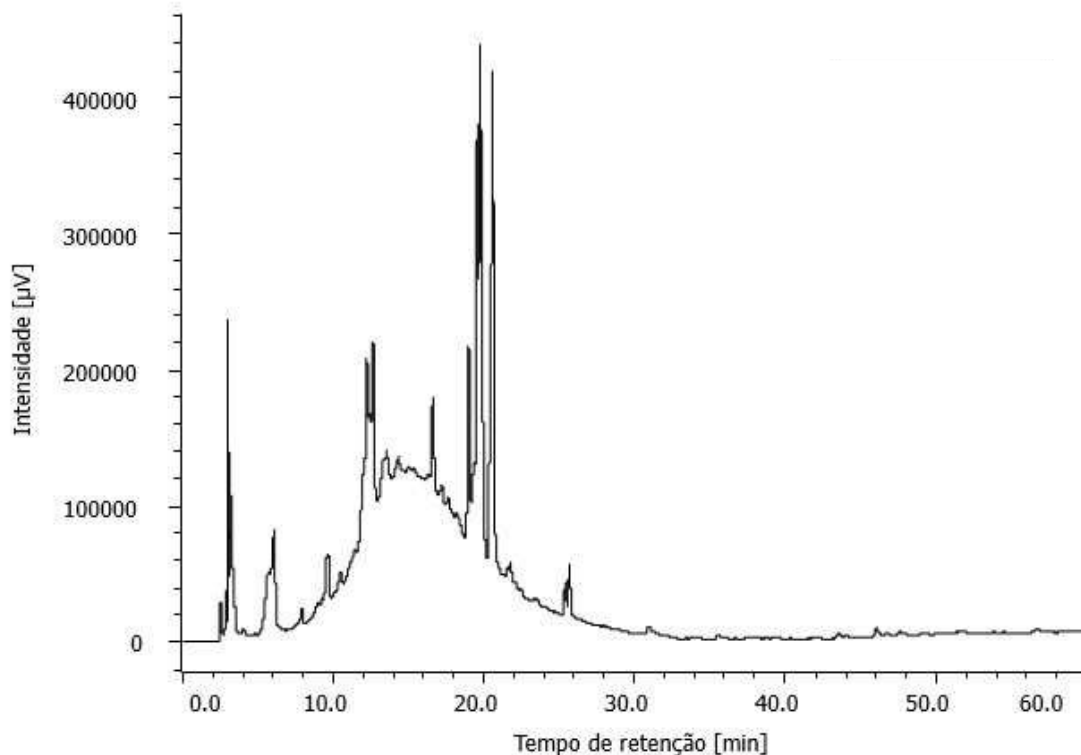


Com o objetivo de diminuir o número de etapas e o consumo de reagentes, foi realizado uma segunda avaliação de *clean-up* (Esquema 1, “*clean-up 2*”) levando em consideração a composição das frações analisadas no primeiro experimento.

No cromatograma da fr. 3:7 (Figura 6), foi possível observar a presença das substâncias da fr. 9:1e fr. 1:1 pela comparação dos tempos de retenção e espectros UV.

Nesse novo procedimento, observa-se que foi possível concentrar as substâncias representativas do extrato em uma única fração, com apenas uma eluição. Esse método possibilitou o preparo da amostra de *B. intermedia* em menor tempo e com menor desperdício de solventes, obedecendo os princípios da Química Verde. Portanto, foi o escolhido para ser utilizado nas próximas etapas do trabalho dessa espécie.

Figura 6. Cromatograma da fr. 7:3 do segundo método de clean-up avaliado para o EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), pré-coluna (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ =254 nm.



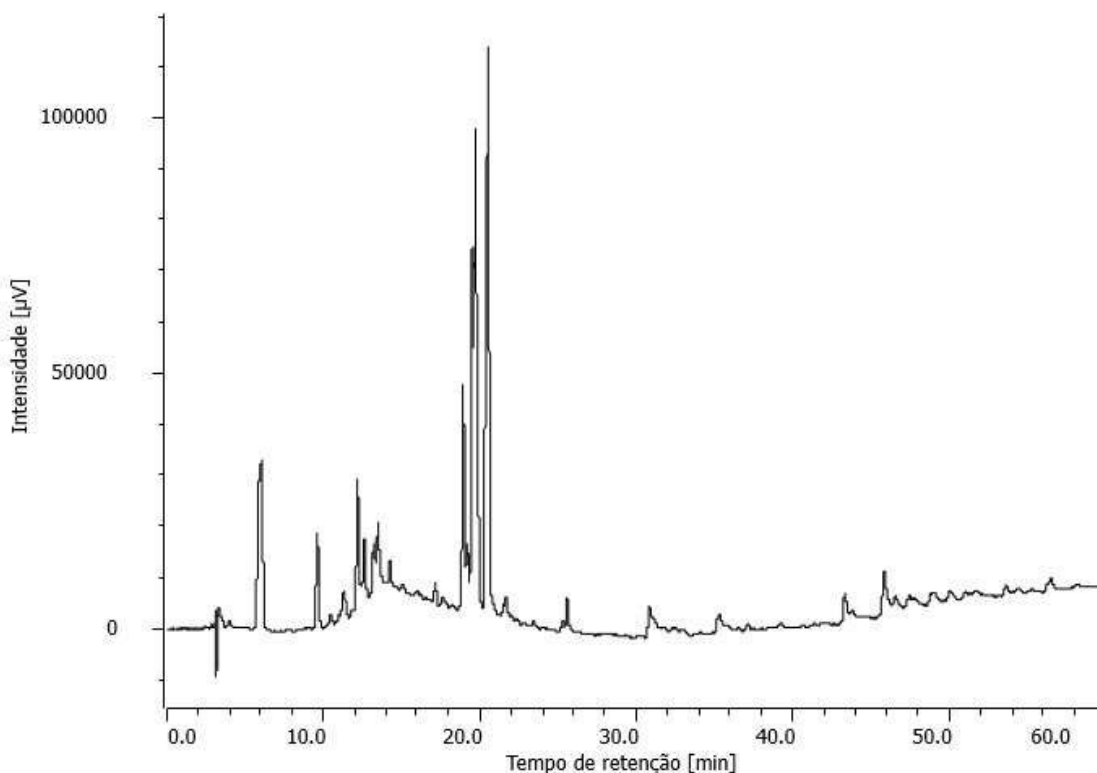
Em todas as análises realizadas por CLAE no desenvolvimento do *clean-up*, foi possível observar grande absorção na linha de base dos cromatogramas na região de 10 a 20 min, que pela análise dos espectros UV poderia estar relacionada com a presença de grande quantidade de taninos.

Para melhorar a linha de base, realizamos partição líquido-líquido água/acetato de etila (5:2, v/v), em escala reduzida (total de 6 mL), do EHA antes da extração em fase sólida para a redução da quantidade de taninos (Esquema 1, “clean-up 3”; RODRIGUES, 2007). A escolha do acetato de etila foi baseada em sua classificação verde nas métricas da ACS e Pfizer.

Após realizada a partição líquido-líquido, a fração acetato foi seca e submetida a extração em fase sólida, utilizando o procedimento “clean-up 2” (Esquema 1).

Como é possível observar no cromatograma (Figura 7), com a partição realizada foi possível obter uma melhora significativa da linha de base entre a região de 10 a 20 min.

Figura 7. Cromatograma da fr. 3:7 (segundo método) do clean-up avaliado para o EHA das folhas de *B. intermedia* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); pré coluna C18 (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ =254 nm.



4.1.2 Triagem de variáveis de *B. Intermedia*

Para a determinação dos efeitos dos parâmetros cromatográficos na separação dos constituintes do EHA das folhas de *B. intermedia* por CLAE-DAD, utilizando EtOH e água como fase móvel, foi realizado um planejamento fatorial fracionário de cinco fatores e dois níveis (Tabela 2).

O planejamento fatorial fracionário utilizado, com dois níveis e cinco fatores (2^{5-1}) e quatro pontos centrais, resultou em vinte experimentos (Tabela 4).

Uma das vantagens de aplicar esse tipo de planejamento é que se realiza apenas uma fração dos experimentos que seriam empregados (aproximadamente metade, em comparação com o planejamento fatorial Completo), o que está de acordo com as premissas da Química Verde.

As respostas utilizadas para a determinação das variáveis de maiores efeitos na separação dos metabólitos secundários do EHA de *B. intermedia* foram o número de bandas cromatográficas presentes nos cromatogramas dos experimentos e a função-

resposta GCFR (*Green Chromatographic Fingerprint Response*, Equação 1; FUNARI et al., 2014).

Equação 1. Função-resposta GCFR (*Green Chromatographic Fingerprint Response*).

$$\text{GCFR} = n^x \left(\frac{FP}{MP} \right) \left(\frac{n}{t} \right)$$

Em que **n** é o número total de bandas cromatográficas de um dado cromatograma, **x** é o expoente de **n** (onde dependendo do objetivo, pode-se aumentar ou diminuir a importância de **n** aplicando valores de 0, 1 e 2, podendo dessa forma realizar comparativo entre valores de forma mais eficiente), **t** é o tempo total de execução, **FP** é o número de bandas cromatográficas na seção do cromatograma com menos bandas cromatográficas e **MP** é o número de bandas cromatográficas (a razão entre FP e MP indica o quão uniforme é a distribuição do número de bandas cromatográficas no cromatograma). Em resumo, o GCFR contém três termos complementares e foi projetado para maximizar o número de bandas cromatográficas e sua distribuição em todo o cromatograma, enquanto também tenta maximizar o número de bandas cromatográficas por minuto de análise. Quanto maior a pontuação de GCFR para uma dada análise, melhor (FUNARI et al., 2014).

Baseado no perfil cromatográfico e composição química relatada em artigos científicos, optou-se por fixar o tempo de análise em 30 min, considerando ser tempo suficiente para separar a quantidade de metabólitos presentes no EHA das folhas de *B. Intermedia*. O volume de injeção e concentração da amostra também foram fixados com valores de 20 μL e 1 g.L^{-1} (10 mg/mL), respectivamente.

Como é possível observar, o experimento que apresentou maior número de bandas cromatográficas e GCFR foi experimento 14 (Tabela 9).

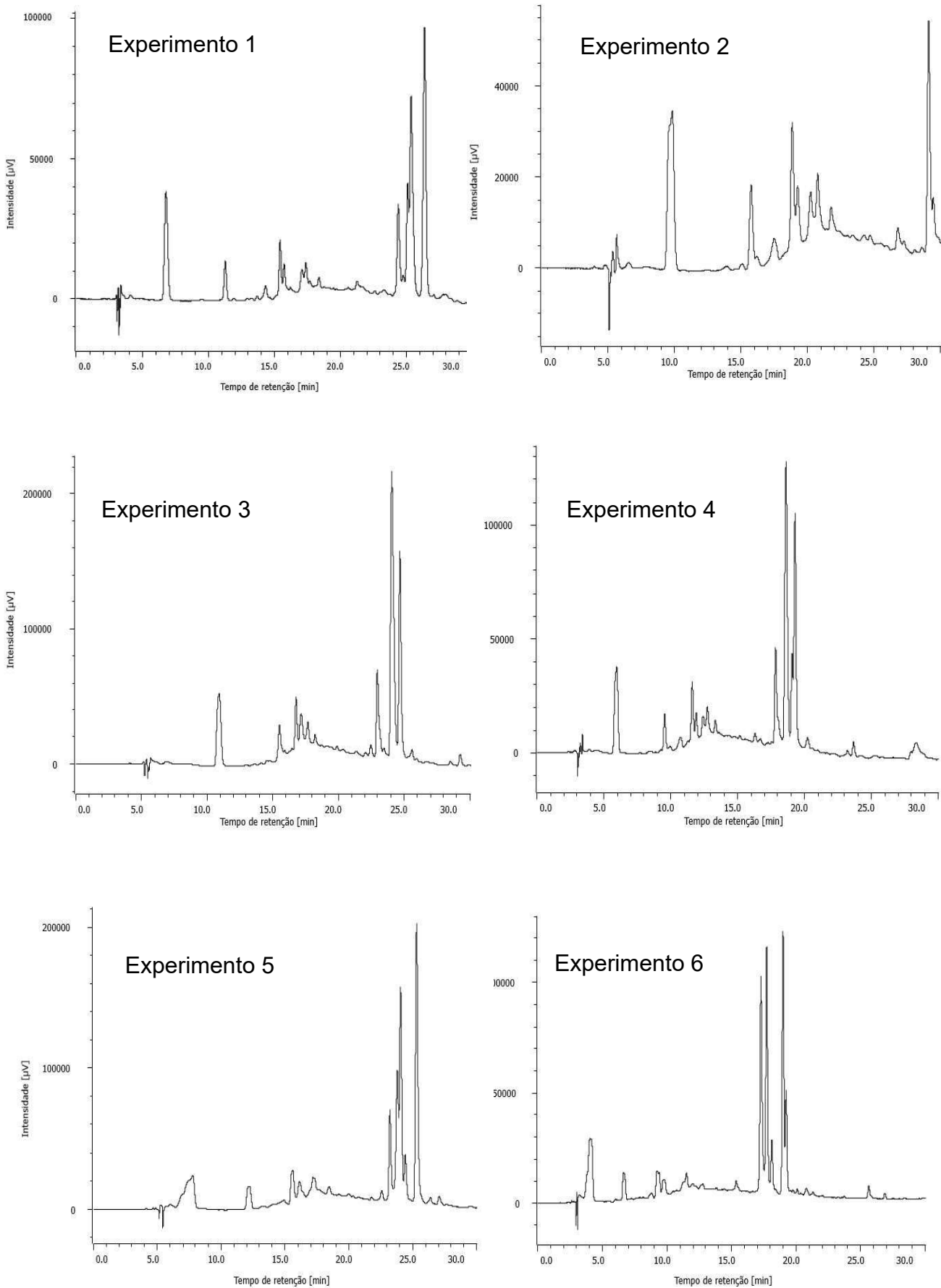
Visualmente, podemos observar que o experimento citado possui o cromatograma com algumas das melhores distribuições de bandas cromatográficas (Figura 8 e 9).

Tabela 9. Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento fatorial fracionário de dois níveis e cinco fatores (2^{5-1}) do EHA das folhas de *B. intermedia*.

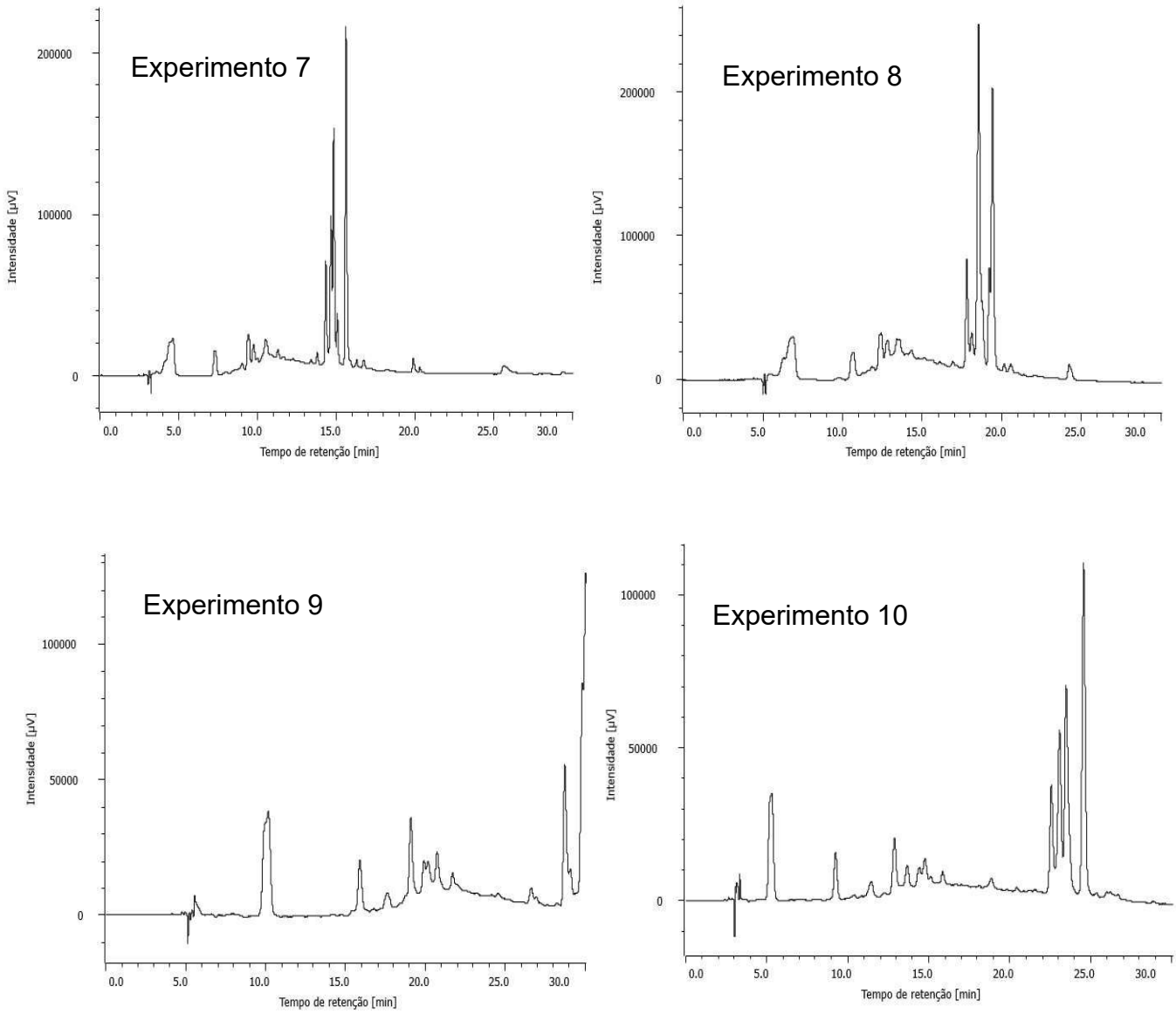
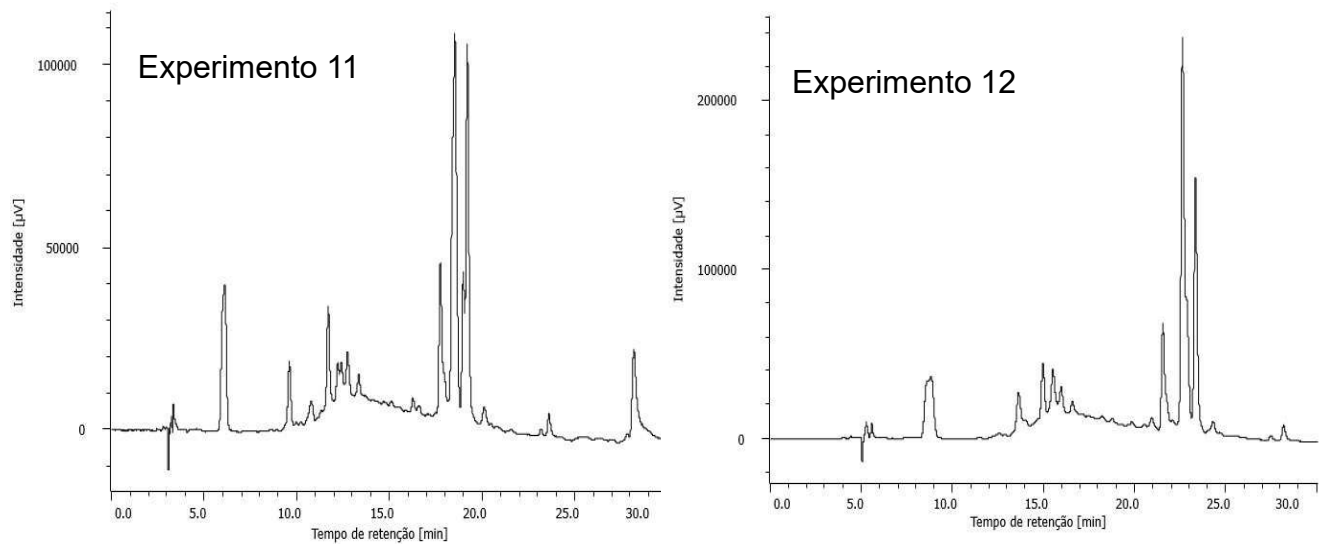
Exp.	X1	X2	X3	X4	X5	Nº de Bandas	GCFR	GCFR
							(x=1)	(x=2)
1	-1	-1	-1	-1	+1	16	6,6	106,2
2	+1	-1	-1	-1	-1	15	6,6	98,4
3	-1	+1	-1	-1	-1	20	8,9	177,8
4	+1	+1	-1	-1	+1	21	7,4	154,4
5	-1	-1	+1	-1	-1	17	8,6	145,6
6	+1	-1	+1	-1	+1	18	5,4	97,2
7	-1	+1	+1	-1	+1	17	1,3	21,8
8	+1	+1	+1	-1	-1	17	4,0	68,2
9	-1	-1	-1	+1	-1	14	4,9	68,6
10	+1	-1	-1	+1	+1	16	5,1	81,9
11	-1	+1	-1	+1	+1	18	5,4	97,2
12	+1	+1	-1	+1	-1	14	4,9	68,6
13	-1	-1	+1	+1	+1	19	5,6	105,5
14	+1	-1	+1	+1	-1	19	10,8	205,8
15	-1	+1	+1	+1	-1	18	3,1	55,5
16	+1	+1	+1	+1	+1	18	1,4	24,3
17	0	0	0	0	0	20	7,2	143,6
18	0	0	0	0	0	20	7,2	143,6
19	0	0	0	0	0	20	7,2	143,6
20	0	0	0	0	0	20	7,2	133,4

Nota: X1. % inicial de EtOH; X2. % final de EtOH; X3. Temperatura das análises; X4. % de AcOH; X5. Vazão.

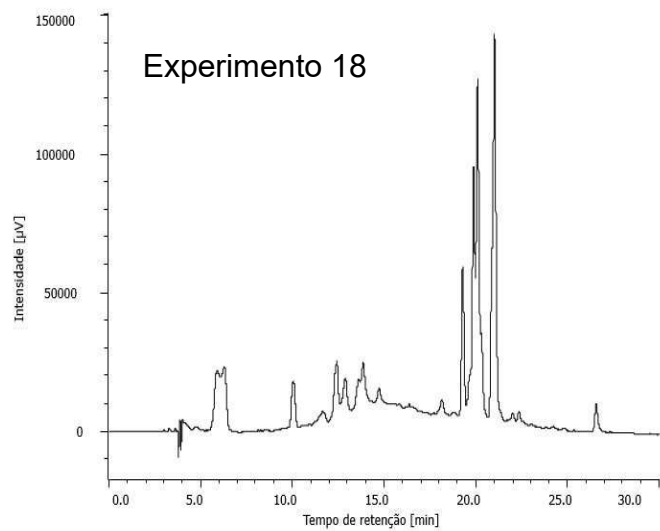
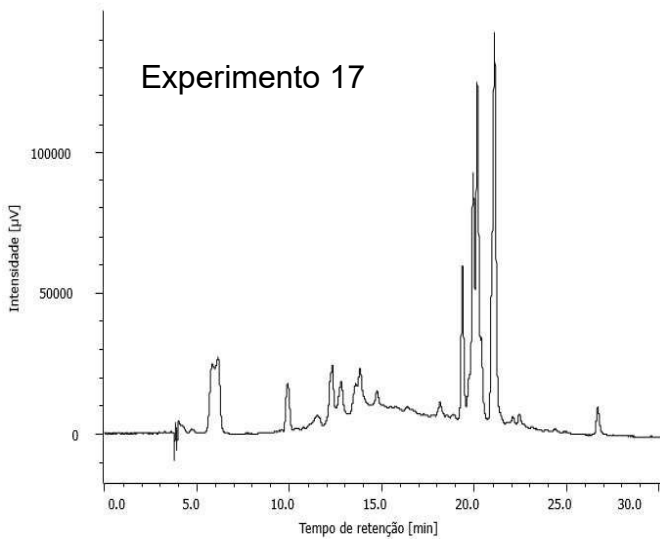
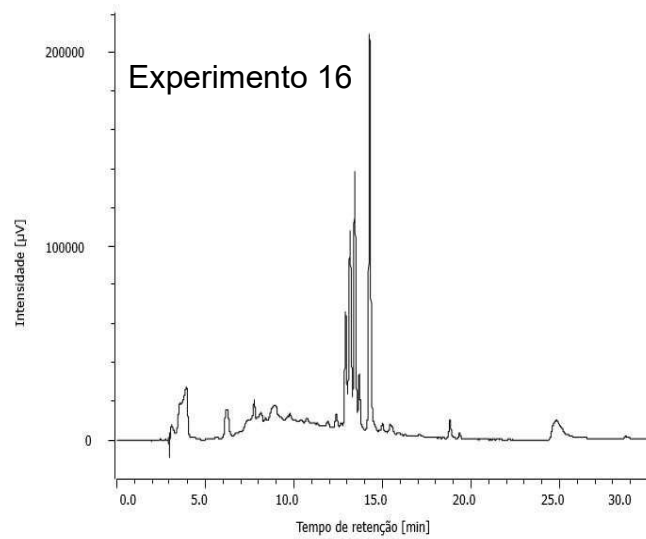
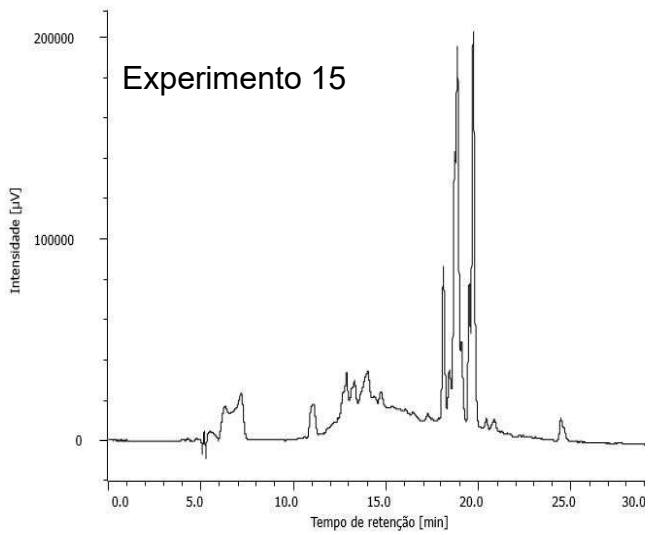
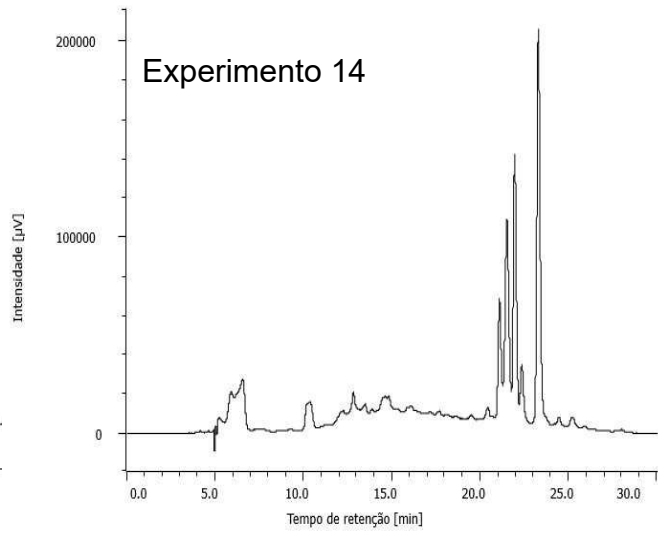
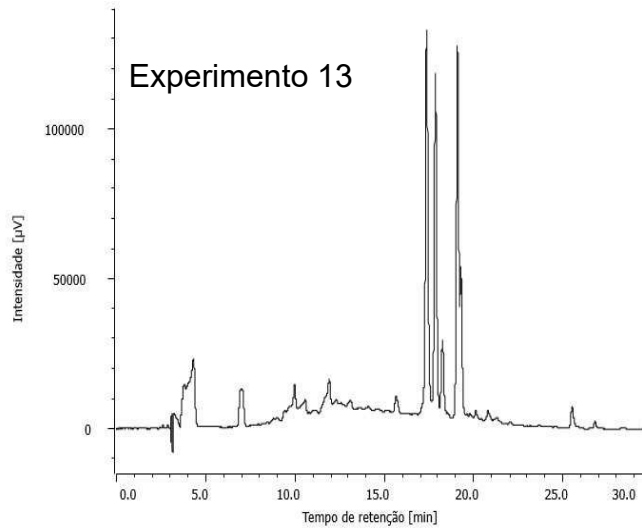
As respostas analisadas representam uma leitura quali e quantitativa de uma relação entre o número de picos e a sua distribuição por todo o cromatograma em um determinado intervalo de tempo. É uma abordagem de extrema relevância no desenvolvimento de métodos cromatográficos de extratos vegetais, bem como de outras matrizes complexas. Quanto maior o valor obtido de GCFR para uma determinada análise, melhor a distribuição dos picos ao longo do cromatograma.

Figura 8. Cromatogramas da triagem de variáveis de *B. Intermedia* dos experimentos 1 a 10.

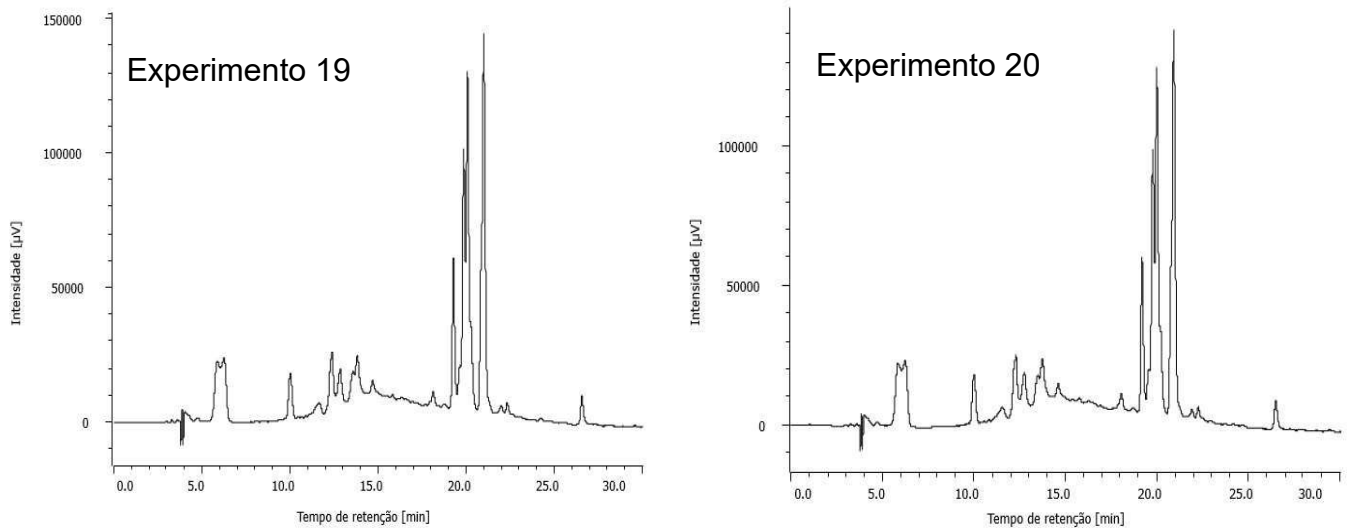
Continuação figura 8.

Figura 9. Cromatogramas da triagem de variáveis de *B. Intermedia* dos experimentos 11 a 20.

Continuação figura 9.



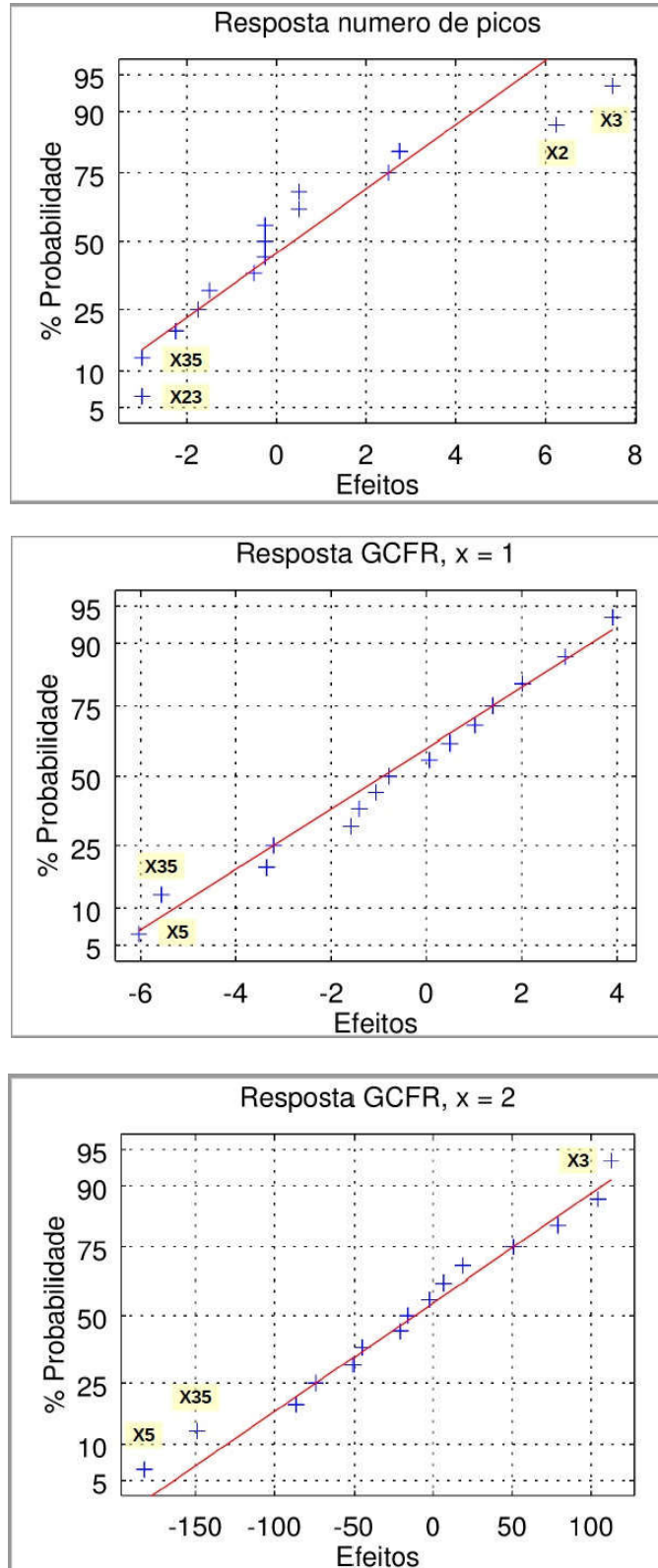
Continuação figura 9.



Os dados foram processados no programa gratuito GNU Octave® ver. 4.0.0., em que foi possível determinar os efeitos para os números de bandas, GCFR ($x=1$) e GCFR ($x=2$).

Como é possível observar no gráfico normal da resposta número de bandas cromatográficas (Número de picos; Figura 10), os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os referentes aos fatores X2 (% final de EtOH); X3 (Temperatura da análise) e X5 (Vazão), sendo este último interagindo com a X3 (X35). Nos gráficos de probabilidade normal das respostas GCFR ($X=1$) e GCFR ($x=2$) (Figura 10), os fatores X3 e X5 apresentaram maiores efeitos. Visto que os fatores em destaque estão relativamente afastados da linha, significando que os mesmos possuem uma maior intensidade sobre os componentes do extrato.

Figura 10. Gráfico dos valores dos efeitos calculados para: resposta N° de bandas cromatográficas (Picos), GCFR (x=1), GCFR (x=2).



O fator X2 (% final de EtOH) interfere na taxa de aumento de EtOH na fase móvel, ou seja, interfere diretamente na força de eluição da fase móvel. Maiores taxas de

aumento de EtOH proporcionam maior força de eluição e, portanto, as substâncias interagem menos com a fase estacionária, podendo provocar co-eluição de substâncias, o que diminui o número de bandas no cromatograma, além de ocasionar eluição das substâncias em menor tempo prejudicando a distribuição das bandas ao longo do cromatograma. As menores taxas de aumento de EtOH provocam o efeito inverso, porém, menores taxas podem resultar em análises com tempo muito longo e bandas alargadas prejudicando a resolução.

A Temperatura (X3) é um fator mais complexo, pois seu valor é inversamente proporcional a viscosidade da fase móvel, diretamente proporcional ao aumento da solubilidade dos analitos na fase móvel e também diretamente proporcional ao número de equilíbrios dos analitos com a fase móvel e fase estacionária [interfere no número de pratos teóricos (N) e com aumento da temperatura ocorre o estabelecimento de um prato teórico mais rapidamente]. Valores muito altos de temperatura pode ocasionar em eluições mais rápidas que pode provocar co-eluições e valores menores pode provocar maiores tempos de eluição, prejudicando a resolução.

O X5 corresponde a vazão da fase móvel e, segundo Snyder (2010), com a diminuição da vazão há um aumento dos números de pratos teóricos, ou seja, ocorre maior número de equilíbrios entre as interações das substâncias com a fase estacionária e fase móvel que proporciona maior eficiência na separação. Além disso, a vazão também interfere na pressão do sistema, com o aumento da vazão acarreta o aumento da pressão e em sistemas CLAE ao se utilizar EtOH, mais viscoso que MeCN, pode exceder a pressão máxima de 40 Mpa. E conforme pode ser observado nos experimentos realizados, os que apresentaram menor vazão foram os com as melhores respostas (Tabela 9). Devido a esses fatos, essas três variáveis foram submetidas a avaliações mais precisas com maior número de níveis pelo Planejamento do Composto Central (CCD).

Obteve-se um experimento com pontuação de GCFR acima dos demais experimentos, demonstrando condições ideais com relação às variáveis não identificadas nos gráficos, porém, não foi aplicada essas condições identificadas, devido a preocupação com o impacto ambiental gerado pela metodologia a ser desenvolvida.

Portanto, a otimização dos parâmetros cromatográficos deve ser realizada por um estudo heurístico do sistema para que seja alcançado os valores ótimos desses parâmetros.

4.1.3 Planejamento do Composto Central (PCC) do EHA das folhas de *B. Intermedia*

Assim, visto a necessidade de obter informações mais precisas das variáveis importantes, foi realizado o Planejamento do Composto Central (CCD), composto pelas três variáveis (fatores) descritas como principais e com acréscimo de dois eixos axiais, assim as variáveis foram avaliadas em cinco níveis, codificados como (-1,68) como taxa menor e (+1,68) como taxa maior, promovendo uma abrangência maior (Tabela 5), e sendo um refinamento do Planejamento Fatorial Fracionário. A combinação desses novos níveis totalizou 18 experimentos (Tabela 6).

Com a realização dos experimentos nas condições mostradas na Tabela 10, foram obtidos os resultados conforme Tabela 10, sendo o experimento 7 o que apresentou maior valor de GCFR.

Tabela 10. Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento do composto central do EHA das folhas de *B. intermedia*.

Exp.	X2	X3	X5	Nº Bandas	GCFR (x=1)	GCFR (x=2)
1	-1	-1	-1	17	6,7	114,6
2	+1	-1	-1	17	6,7	114,6
3	-1	+1	-1	19	10,8	205,8
4	+1	+1	-1	16	5,1	81,9
5	-1	-1	+1	17	8,6	145,6
6	+1	-1	+1	17	8,6	145,6
7	-1	+1	+1	22	11,2	245,7
8	+1	+1	+1	21	1,5	32,5
9	-1,68	0	0	18	10,8	194,4
10	+1,68	0	0	21	4,6	96,5
11	0	-1,68	0	16	8,5	136,5
12	0	+1,68	0	19	4,3	81,7
13	0	0	-1,68	16	6,6	106,2
14	0	0	+1,68	18	6,9	123,7
CP1	0	0	0	19	8,8	166,3
CP2	0	0	0	19	8,8	166,3
CP3	0	0	0	19	8,8	166,3
CP4	0	0	0	19	8,8	166,3

Nota: X2. % final de EtOH; X3. Temperatura das análises; X5. Vazão.

Após o tratamento dos dados obtidos e calculado a variância de cada valor de número de bandas, GCFR (x=1), GCFR (X=2), obteve-se a tabela ANOVA (Tabelas 11, 12 e 13).

Tabela 11. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR (x=2).

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	126.247,51	9	14.027,50	2,23	3,38
Resíduo	50.221,75	8	6.277,72		
Total	176.469,26	17			
Erro Puro	0	3	0		
Falta de Ajustes	50.221,75	5	10.044,35	-	9,01
Varição Explicada	0,7154	R	0,8458		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Tabela 12. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR (x=1).

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	191,77	9	21,31	2,53	3,39
Resíduo	67,31	8	8,41		
Total	259,08	17			
Erro Puro	0	3	0		
Falta de Ajustes	67,31	5	13,46	-	9,01
Varição Explicada	0,74	R	0,86		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Tabela 13. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para nº de bandas cromatográficas.

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	115,58	9	12,84	4,63	3,39
Resíduo	22,19	8	2,77		
Total	137,78	17			
Erro Puro	0	3	0		
Falta de Ajustes	22,19	5	4,44	-	9,01
Varição Explicada	0,84	R	0,92		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

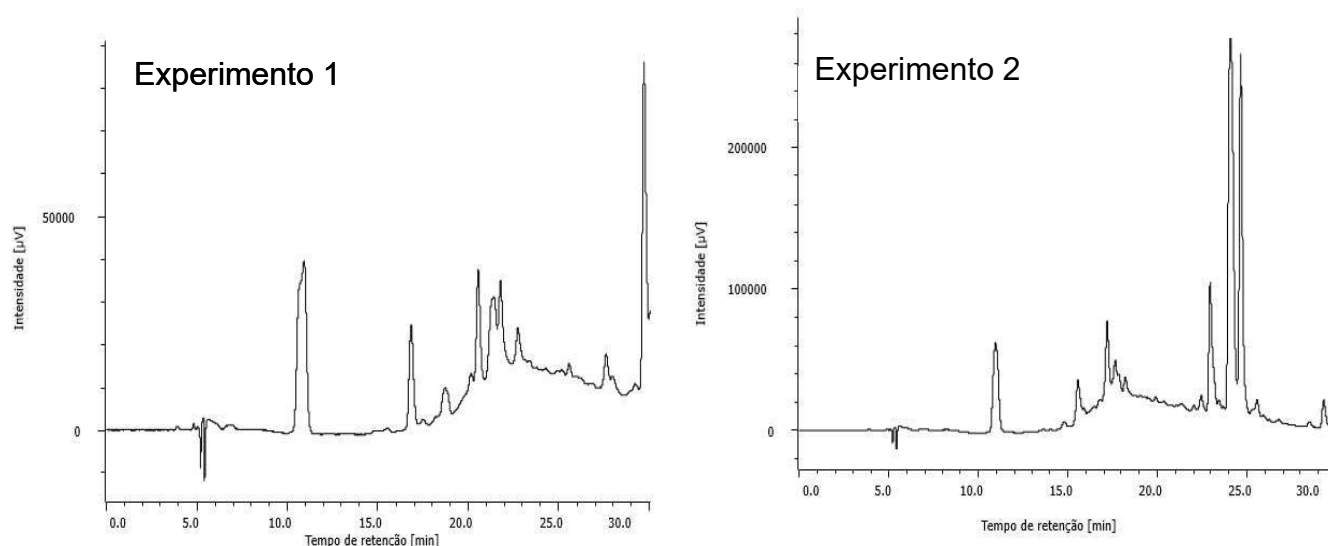
Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Analisando as tabelas ANOVA (Tabelas 11, 12 e 13) é possível verificar que o modelo proposto possui erro puro (que se refere à variabilidade intrínseca das análises) igual a zero, evidenciando que os experimentos CP1, CP2, CP3 e CP4, que correspondem aos pontos centrais (réplicas) foram exatos.

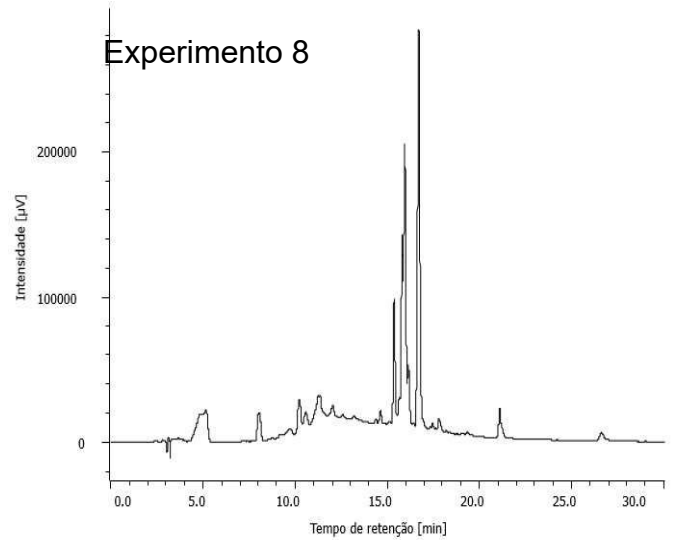
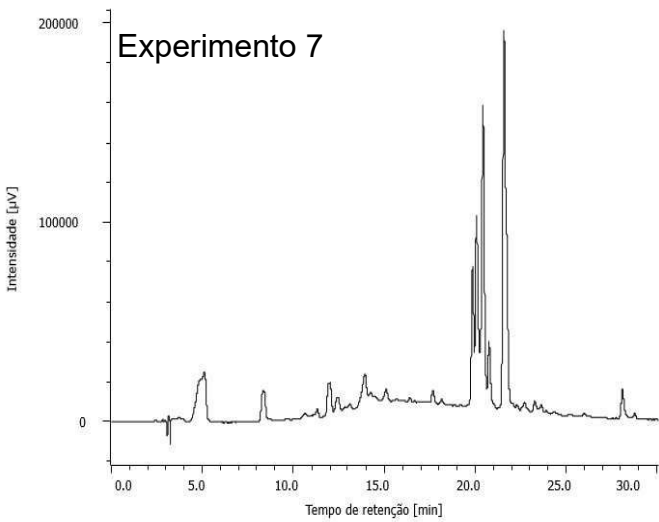
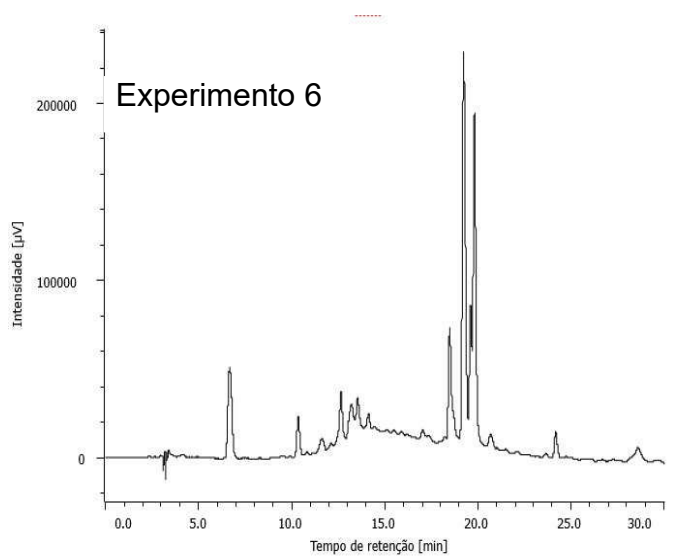
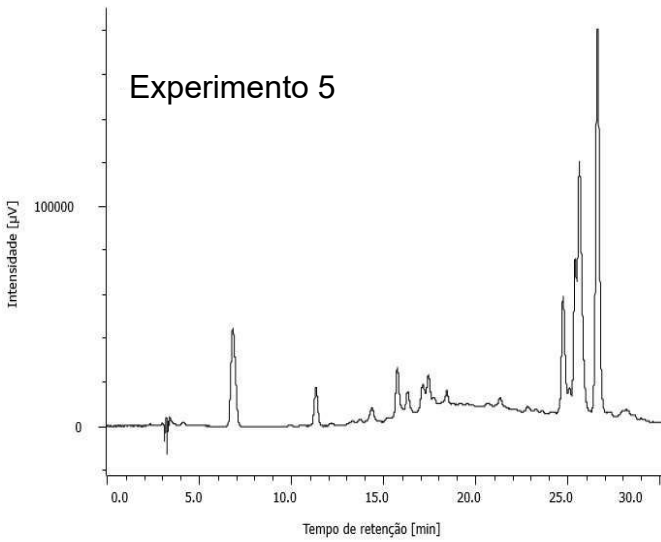
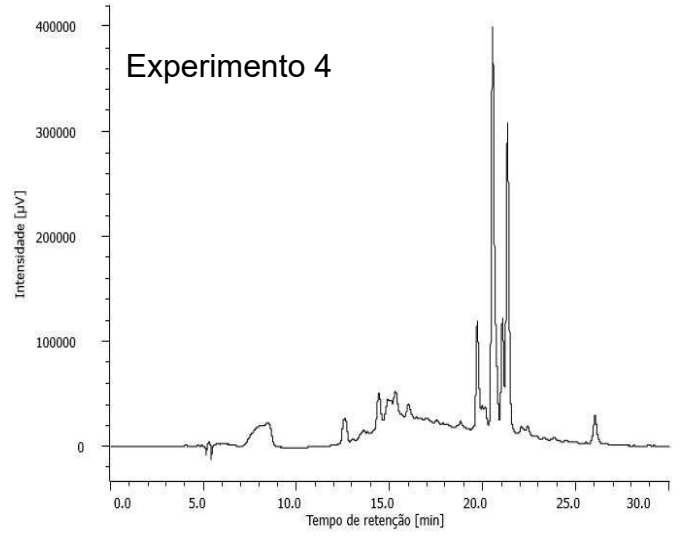
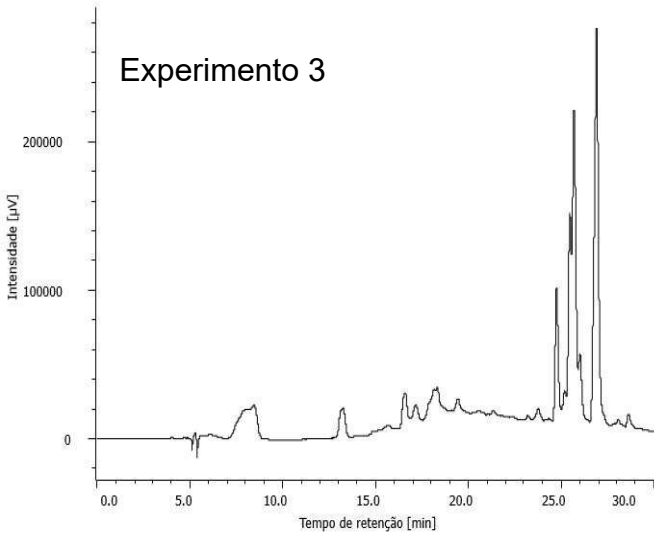
Ao comparar os valores do teste F (relação entre a variável dependente e independente) na relação entre os valores de regressão/resíduo, foi observado que o valor calculado encontra-se abaixo do tabelado (3,38), demonstrando que o modelo não está otimizado (FILHO, 2015).

Já com relação a falta de ajuste/erro puro, não foi possível a realização do teste F devido ao erro puro ser zero, podendo, dessa forma, atribuir a falta de ajuste presente à dificuldade do modelo em prever, neste caso, o valor de GCFR para cada condição apresentada. Outro fator que pode explicar a falta de ajuste do modelo é a variância explicada com valor de 0,7154 (representando 71,54 % da variação, e 28,46% é explicado pelo resíduo), que idealmente seu valor deveria estar próximo de 1 (máximo explicado pela regressão). Na Tabela 10, pode-se observar, também, baixa variação nos números de bandas obtidos para cada experimento, com isso mudanças nos valores das variáveis pode não acarretar variação significativa nos resultados.

Figura 11. Cromatogramas do planejamento do composto central, experimentos de 1 a 10.



Continuação figura 11.



Continuação figura 11.

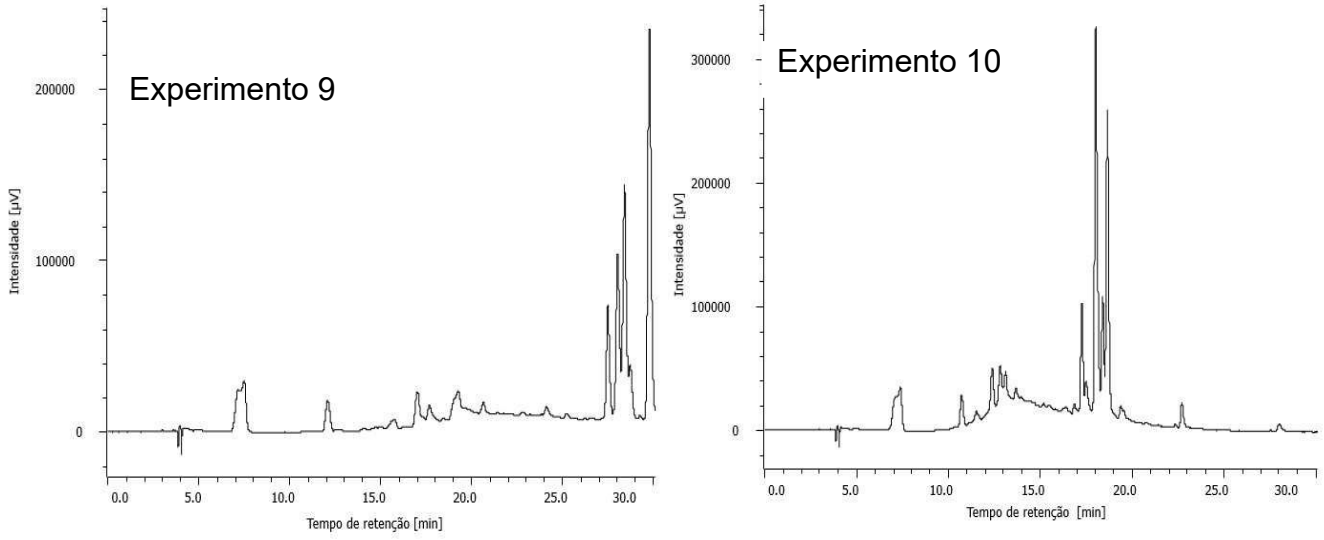
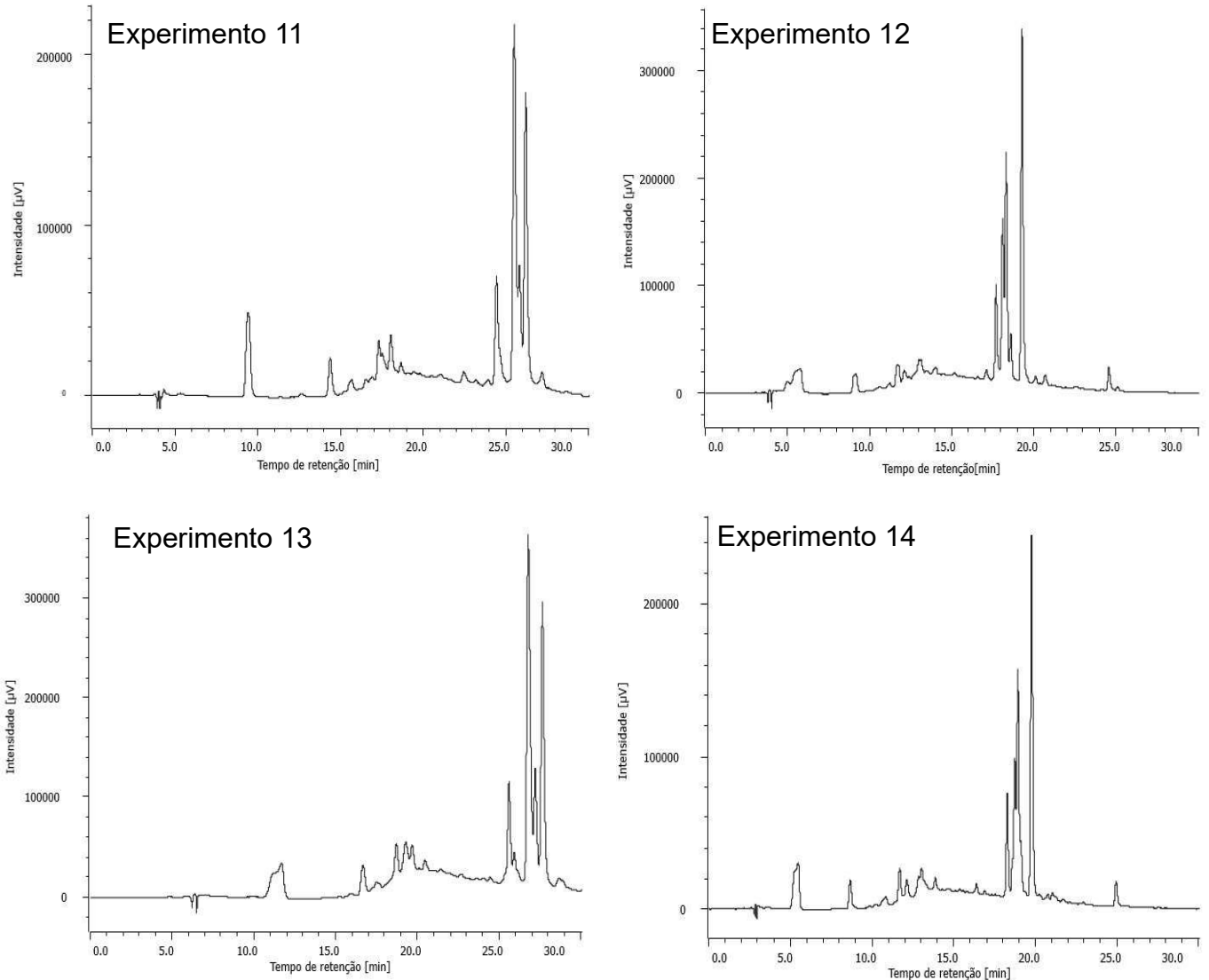
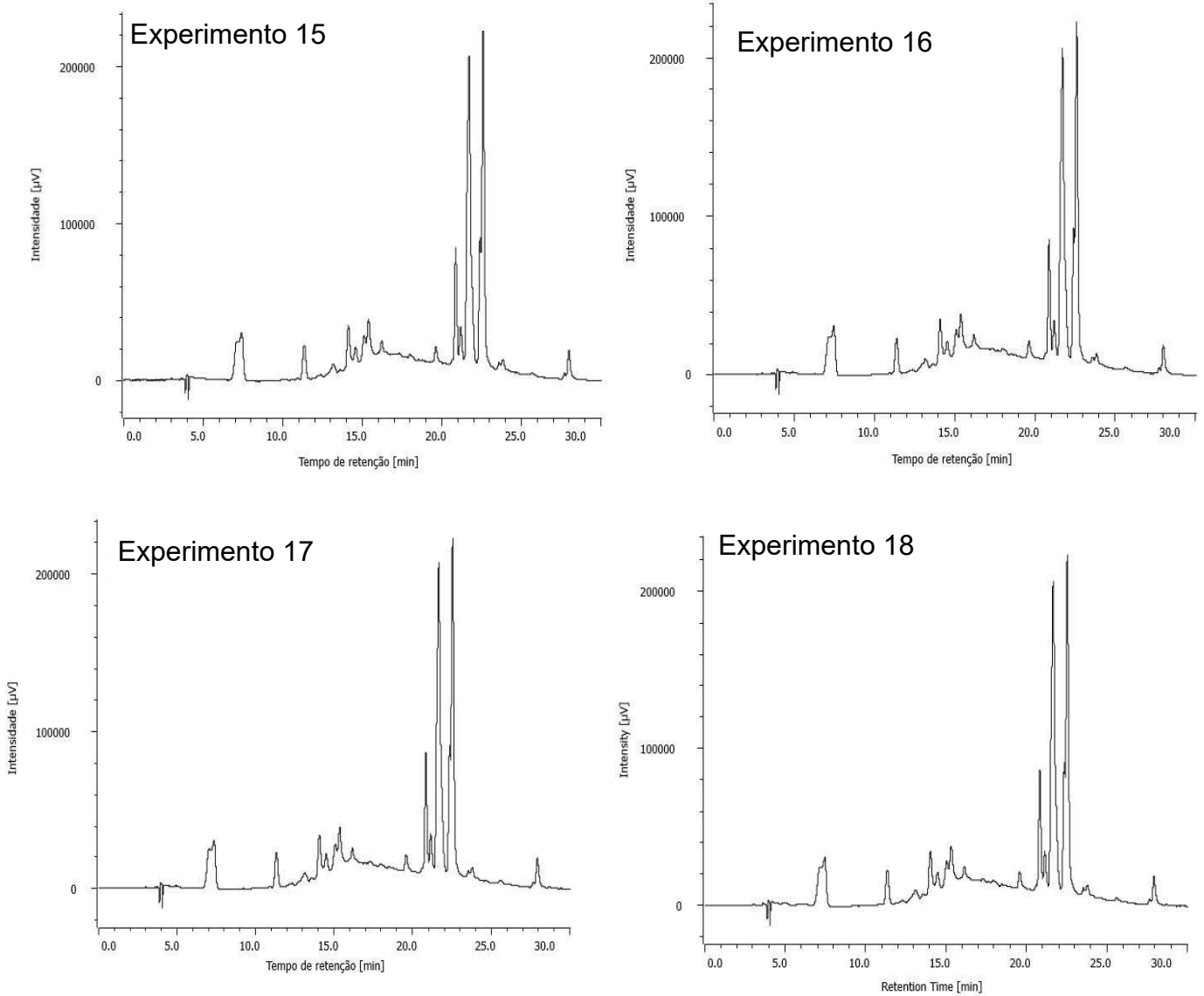


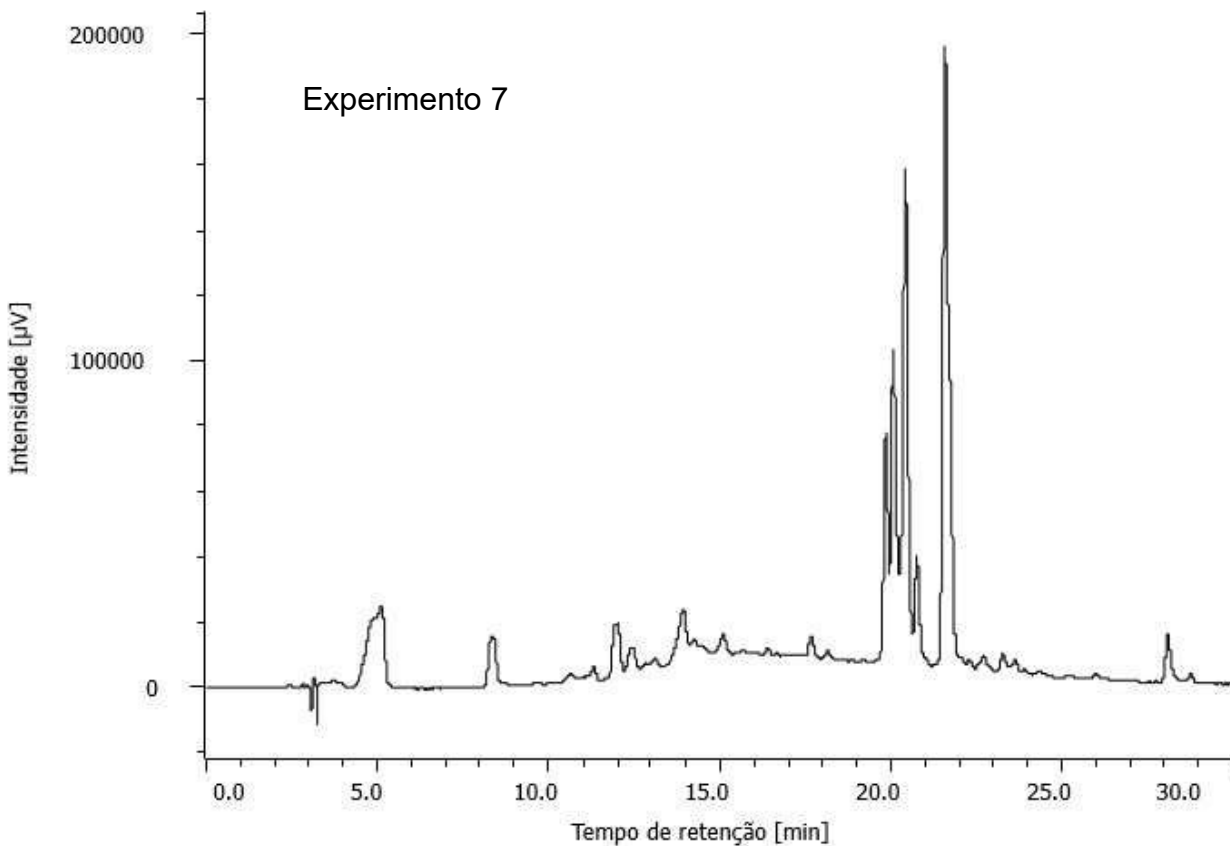
Figura 12. Cromatogramas do planejamento do composto central, experimentos de 11 a 18





Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, o experimento que apresentou o maior número de bandas e maior valor de GCFR foi o experimento 7, resultando no perfil cromatográfico ilustrado na Figura 13.

Figura 13. Perfil cromatográfico ótimo do EHA das folhas de *B. intermedia*.



A partir dos dados obtidos com a triagem de variáveis e do planejamento do composto central, foi possível a determinação de equações matemáticas para o modelo gerado (Equações 2 e 3), de acordo as repostas avaliadas, com o intuito de determinar as condições mais eficientes para a separação dos metabólitos de *B. intermedia*. Para a resposta GCFR ($x=1$) não foi possível obtenção da equação, pois o modelo gerado a partir desses dados não identificou coeficientes significativos.

A partir das equações foi possível obter as superfícies de repostas, nas quais as regiões em vermelho representam as condições necessárias para se obter as maiores repostas (Figura 15).

Equação 2. Modelo matemático do método desenvolvido, com base na resposta GCFR ($x=2$).

$$\text{GCFR } (x=2): 202,43_{(\pm 42,86)} - 86,61_{(\pm 64,29)} * X12$$

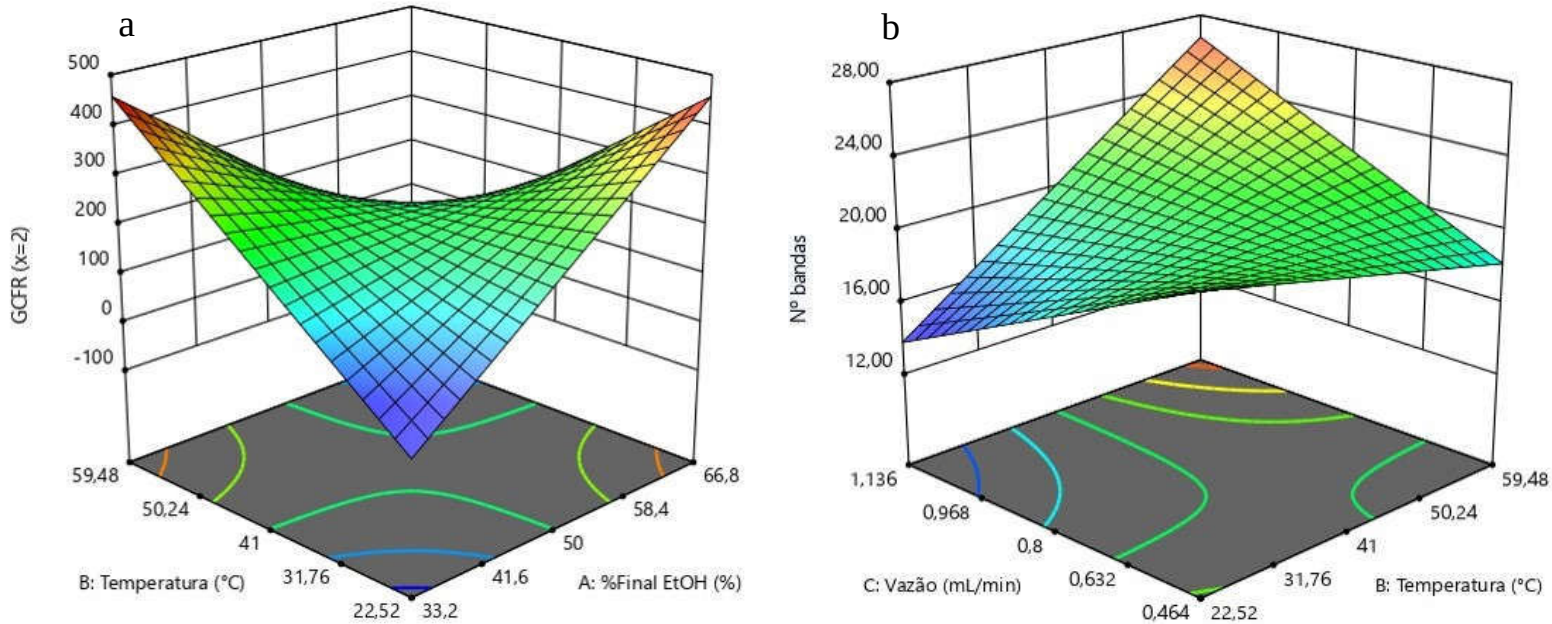
*X12 – representa a interação entre a variável X1= % final EtOH e a X2 = Temperatura.

Equação 3. Modelo matemático do método desenvolvido, com base na resposta N° de picos.

$$\text{Número de bandas} = 20,11_{(\pm 1,17)} + 1,93_{(\pm 1,34)} X2 + 1,50_{(\pm 0,95)} X23$$

* X23 – representa a interação entre a variável X2= Temperatura e X3 = Vazão

Figura 14. Gráficos com base no GCFR ($x=2$) (a: condição 1 e 2) e (b: número de bandas cromatográficas).



A % final EtOH dada como ótima pelo gráfico de superfície para a resposta GCFR ($X=2$) é a que representa a área mais elevada do gráfico (região vermelha), onde, teoricamente estão as melhores condições, desse modo foi escolhido o valor de 33,97% e 66,11% de %final EtOH como valores otimizados. Da mesma forma foi escolhido o valor para Temperatura, com os valores 23,34°C e 58°C, e a vazão foi selecionada com valor de 1,12 mL/min.

Dessa forma as condições indicadas nos gráficos da figura 14, obteve-se as configurações conforme tabela 14:

Tabela 14. Condições otimizadas calculadas.

Fatores	Condição 1	Condição 2
% inicial EtOH	5,0 %*	5,0 %*
% final EtOH	33,97%**	66,11%**
Temperatura	23,34°C**	58°C**
Vazão	1,12 mL/min**	1,12 mL/min**
% ác. Acético na água	0,1 %*	0,1 %*

* Valores fixados para o CCD.

**Valores otimizados com os gráficos de superfície;

Condição 1: representado pela Figura 14a.

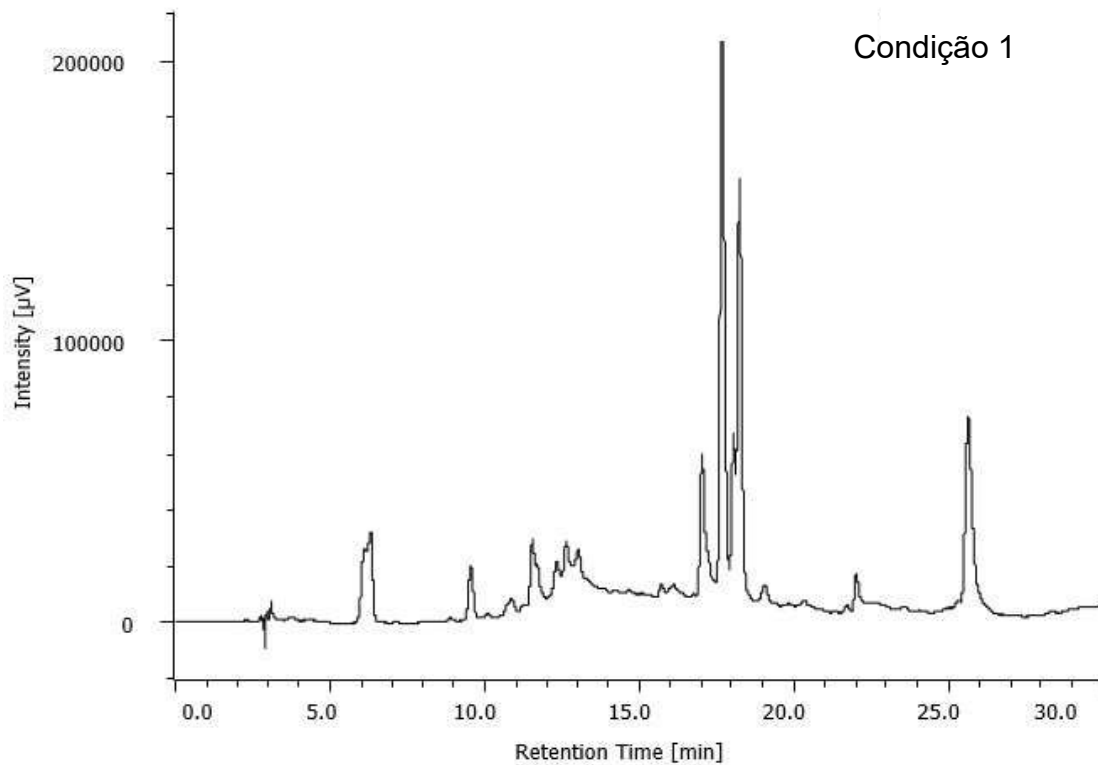
Condição 2: representado pela Figura 14b.

Como é possível observar na tabela 15, a condição 02 foi a que apresentou maiores respostas (número de bandas e GCFR) e melhor resolução entre as bandas majoritárias (Figura 15), sendo portanto a condição ótima para obtenção do perfil cromatográfico de *B. intermedia*.

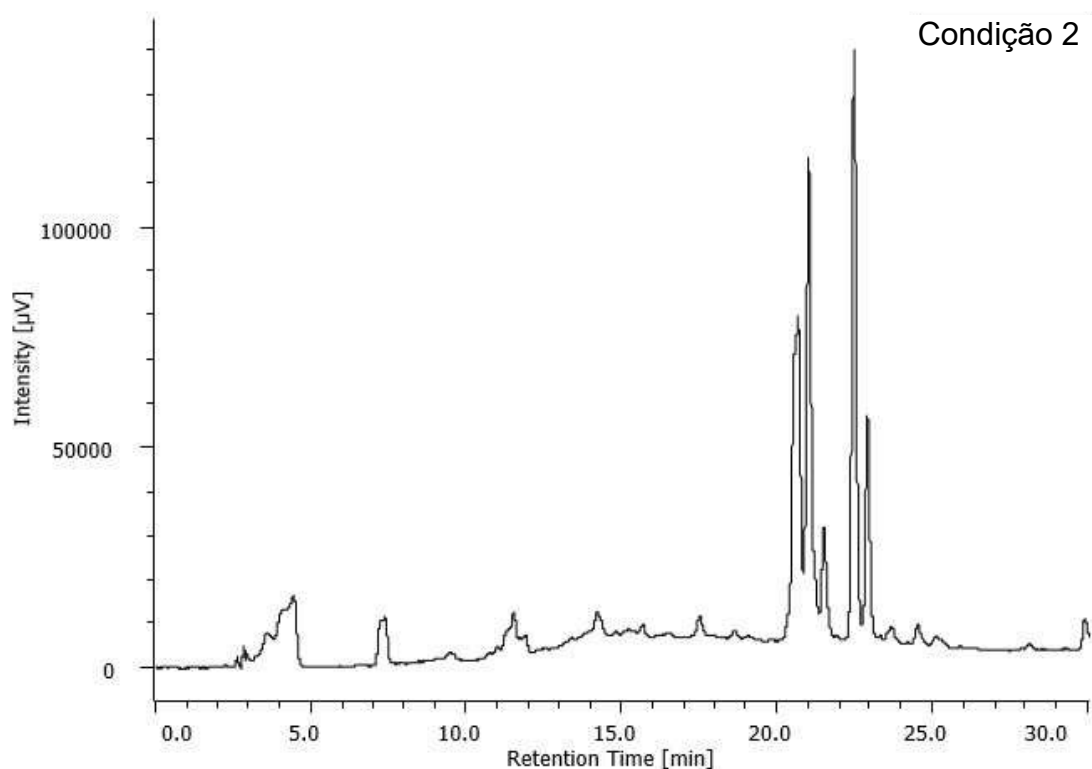
Tabela 15. Experimentos baseados nos gráficos de superfície de resposta.

Condição	Número de bandas	GCFR (x=1)	GCFR (x=2)
01	17	6,7	114,6
02	21	13,4	280,6

Figura 15. Perfis cromatográficos dos experimentos otimizados.



Continuação **figura 15**.



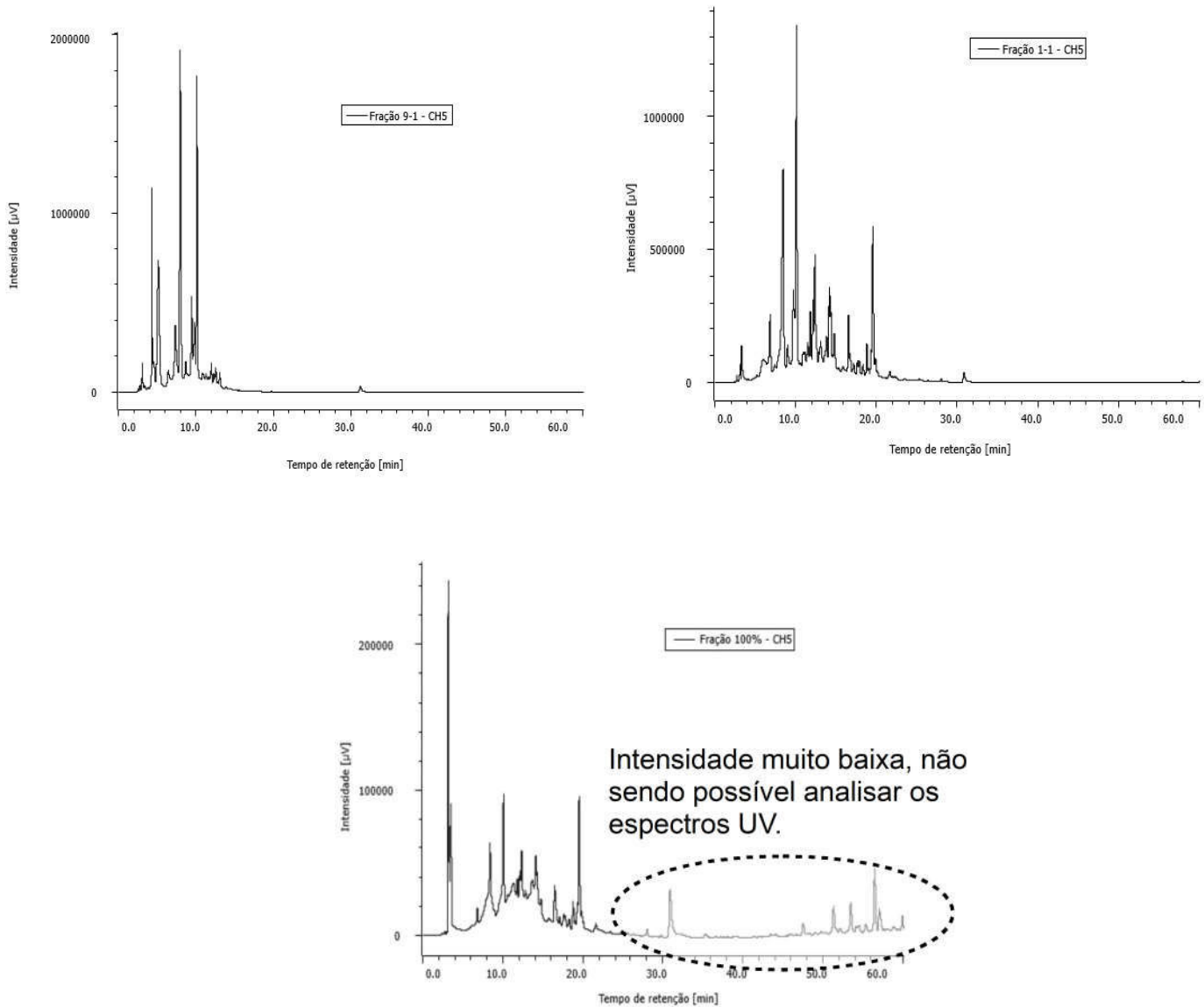
4.2 Desenvolvimento de método verde para análise de *T. catappa*

4.2.1 Avaliação do preparo de amostras (*clean-up*) das folhas de *T. catappa* por CLAE-DAD

Para o *clean-up* do EHA das folhas de *T. catappa* foi realizado o mesmo fracionamento inicial executado para *B. intermedia* (Esquema 1, “*clean-up* 1”).

Porém, após análise dos cromatogramas (Figura 14) das frações foi possível observar que a fração fr. 1:1 contempla, qualitativamente, os mesmos compostos presentes nas outras duas frações (fr. 9:1 e fr. 100%).

Figura 16. Cromatogramas das frações do *clean-up* avaliado para o EHA das folhas de *T. catappa* [Sistema CLAE-DAD; coluna Phenomenex Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm); pré coluna C₁₈ (2 x 7,8 mm); Solvente A: H₂O + 0,5 % AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ=254 nm;



4.2.2 Triagem das variáveis de *T. catappa*

Para a determinação dos efeitos dos fatores cromatográficos na separação dos constituintes do EHA das folhas de *T. catappa* também foi aplicado um planejamento fatorial fracionário de cinco fatores e dois níveis (Tabela 4).

O procedimento utilizado para obtenção desses valores (Tabela 8) foi o mesmo utilizado na triagem das variáveis para a *B. Intermedia*. Para a *T. catappa*, também foi utilizado cinco variáveis no planejamento fatorial fracionário, diferenciando nos valores

dos níveis devido à diferença da composição química entre os extratos. A combinação desses níveis deram origem ao planejamento apresentado na Tabela 4.

As respostas utilizadas nesse planejamento foram, também, número de bandas e a função-resposta GCFR. O tempo de análise foi fixado em 30 minutos para as análises cromatográficas com volume de injeção de 20 µL e concentração de amostra de 1 g.L⁻¹ (10 mg/mL) respectivamente.

A partir dos cromatogramas (Figuras 20 e 21) obtidos, realizou-se a contagem de picos para obtenção de seus respectivos valores de GCFR (Tabela 16).

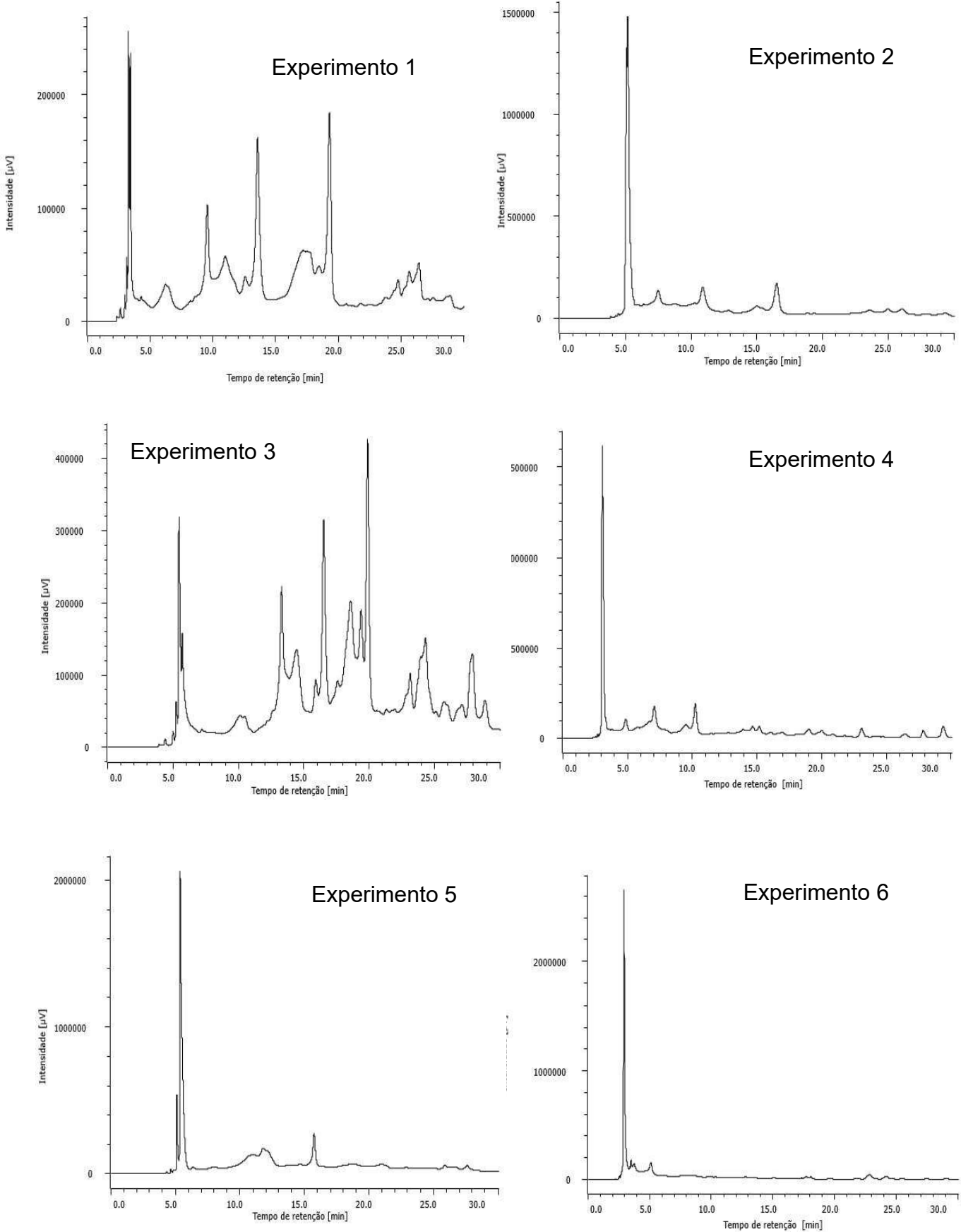
Tabela 16. Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento fatorial fracionário de dois níveis e cinco fatores (2^{5-1}) do EHA das folhas de *T. catappa*.

Exp.	X1	X2	X3	X4	X5	Nº de bandas	GCFR	GCFR
							(x=1)	(x=2)
1	-1	-1	-1	-1	+1	22	16,1	354,9
2	+1	-1	-1	-1	-1	19	7,0	133,4
3	-1	+1	-1	-1	-1	22	13,4	295,8
4	+1	+1	-1	-1	+1	28	19,6	548,8
5	-1	-1	+1	-1	-1	17	5,3	89,3
6	+1	-1	+1	-1	+1	20	10,9	218,2
7	-1	+1	+1	-1	+1	31	30,0	931,0
8	+1	+1	+1	-1	-1	21	11,0	231,5
9	-1	-1	-1	+1	-1	23	13,6	312,0
10	+1	-1	-1	+1	+1	22	11,2	245,7
11	-1	+1	-1	+1	+1	34	23,9	811,0
12	+1	+1	-1	+1	-1	26	16,5	429,6
13	-1	-1	+1	+1	+1	23	16,2	371,8
14	+1	-1	+1	+1	-1	18	6,9	123,7
15	-1	+1	+1	+1	-1	22	13,4	295,8
16	+1	+1	+1	+1	+1	27	10,2	276,3
17	0	0	0	0	0	23	13,6	312,0
18	0	0	0	0	0	23	13,6	312,0
19	0	0	0	0	0	21	13,4	280,6
20	0	0	0	0	0	24	16,2	389,9

Nota: X1. % inicial de EtOH; X2. % final de EtOH; X3. Temperatura das análises; X4. % de AcOH; X5. Vazão.

Os experimentos 7 e 11 foram os que apresentaram maiores valores nas respostas avaliadas.

Figura 17. Cromatogramas da triagem de variáveis de *T. catappa* dos experimentos 1 a 10.



Continuação figura 17.

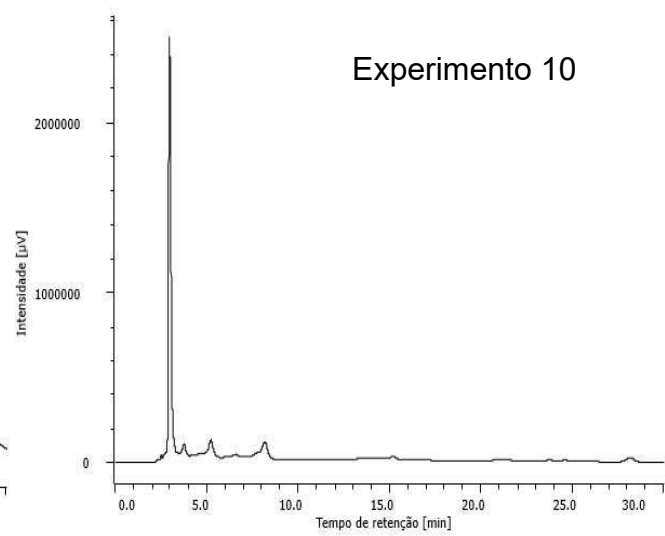
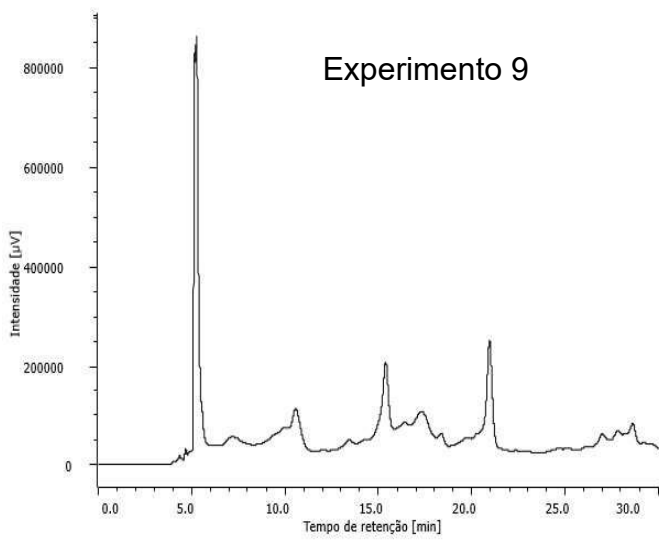
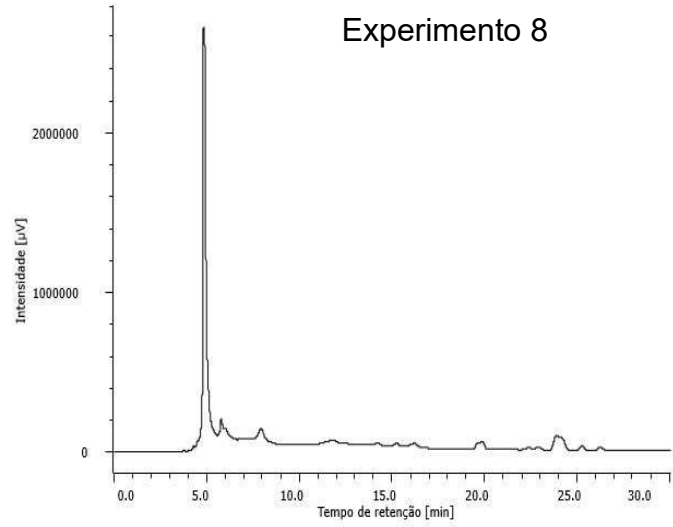
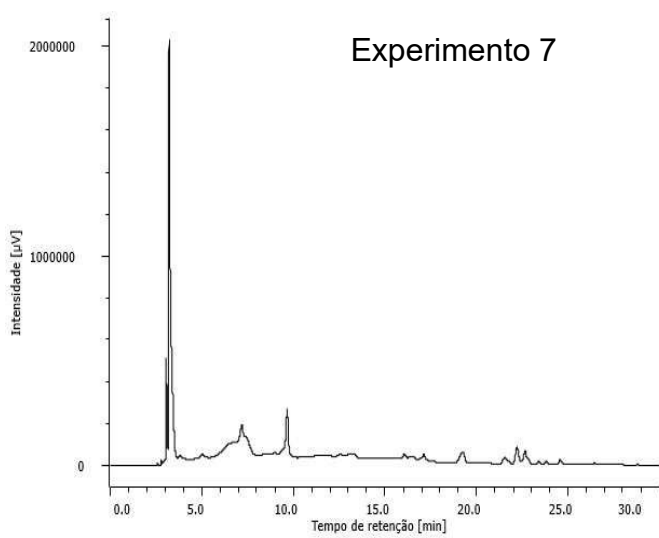
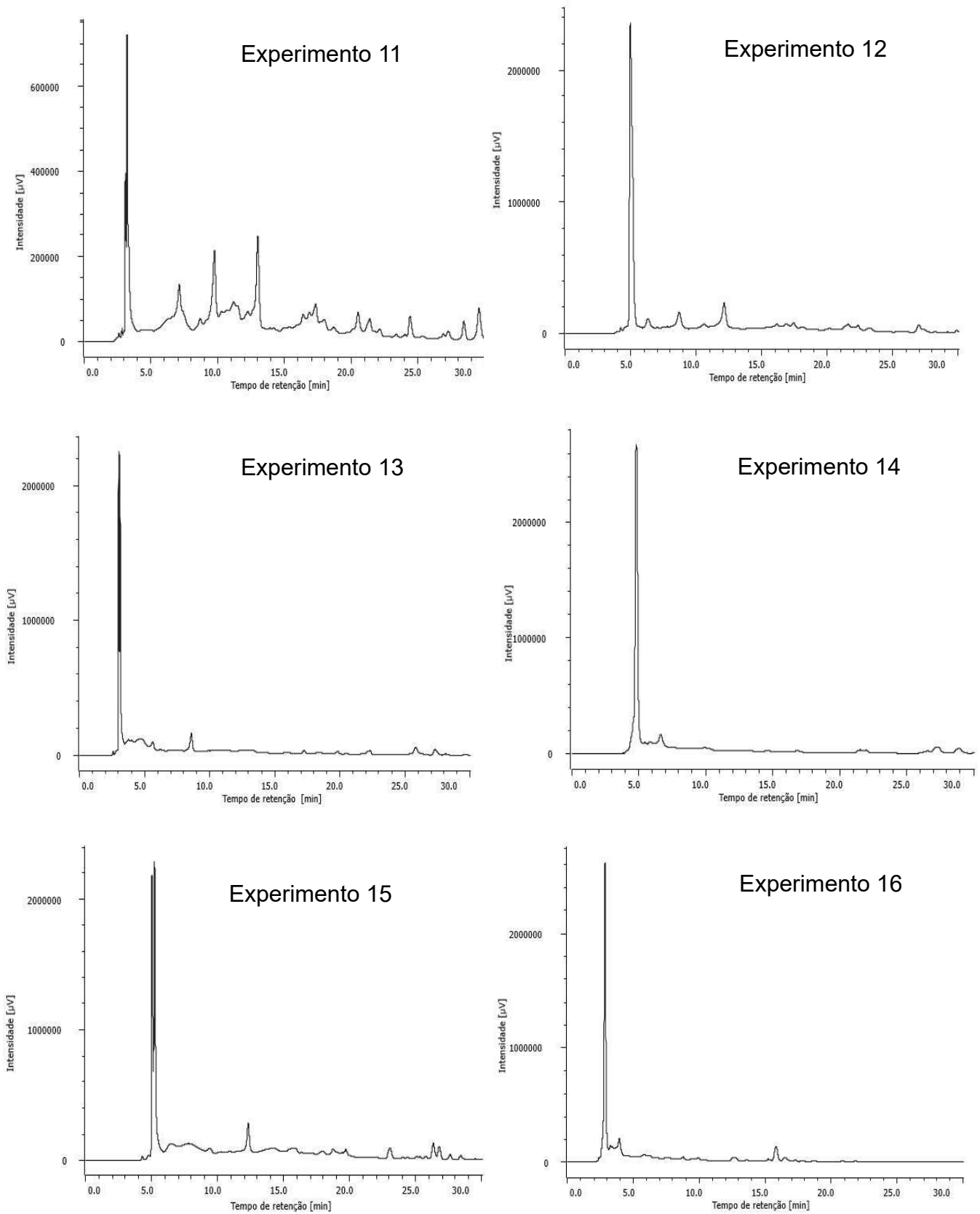
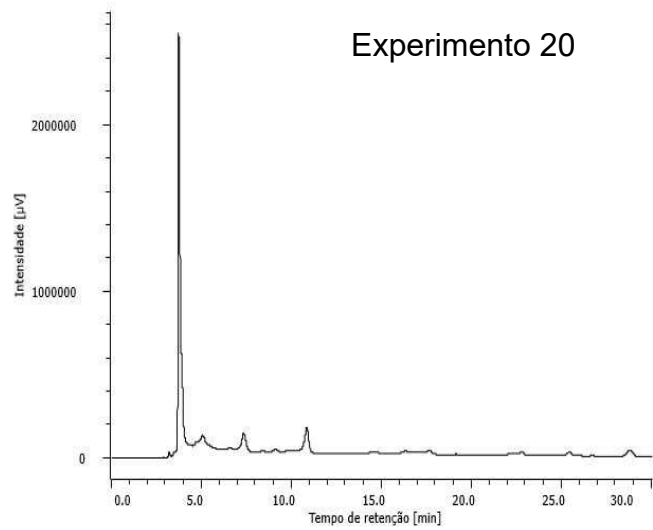
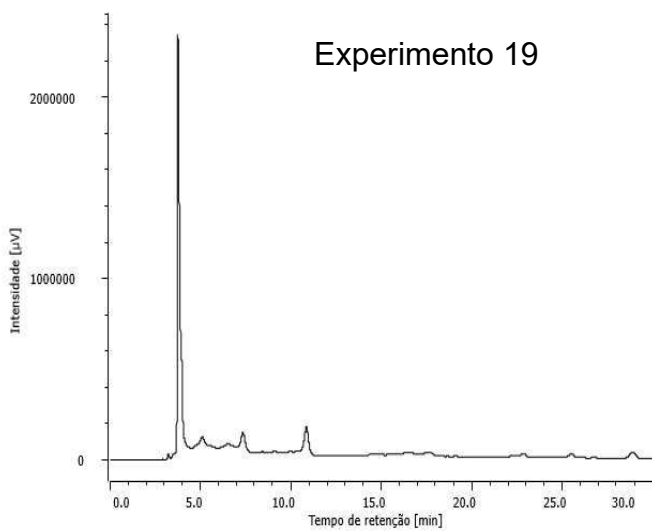
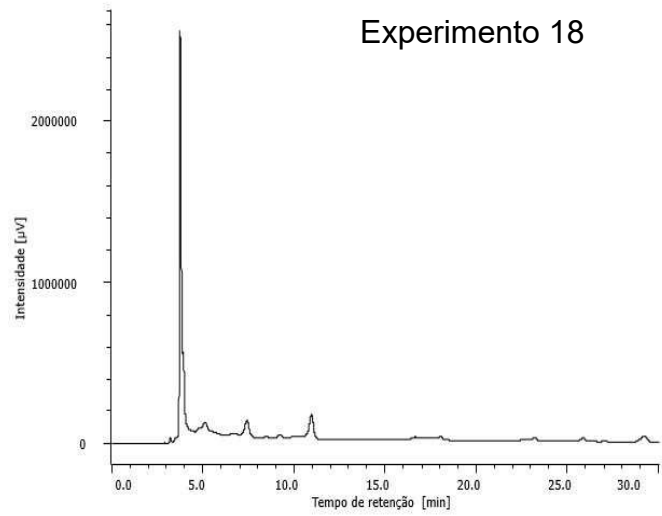
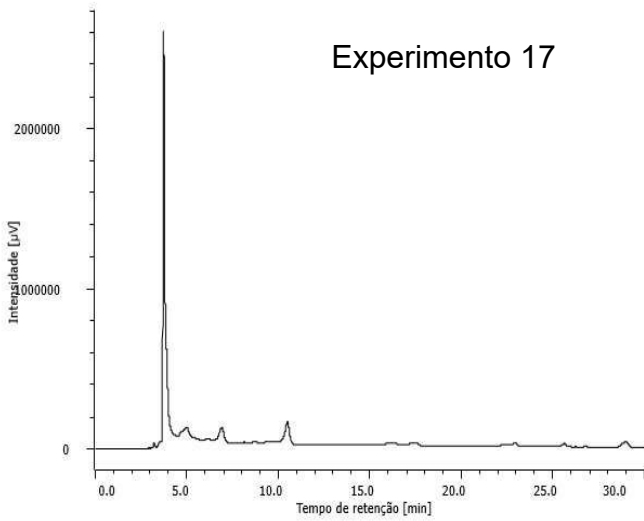


Figura 18. Cromatogramas da triagem de variáveis de *T. catappa* dos experimentos 11 a 20.

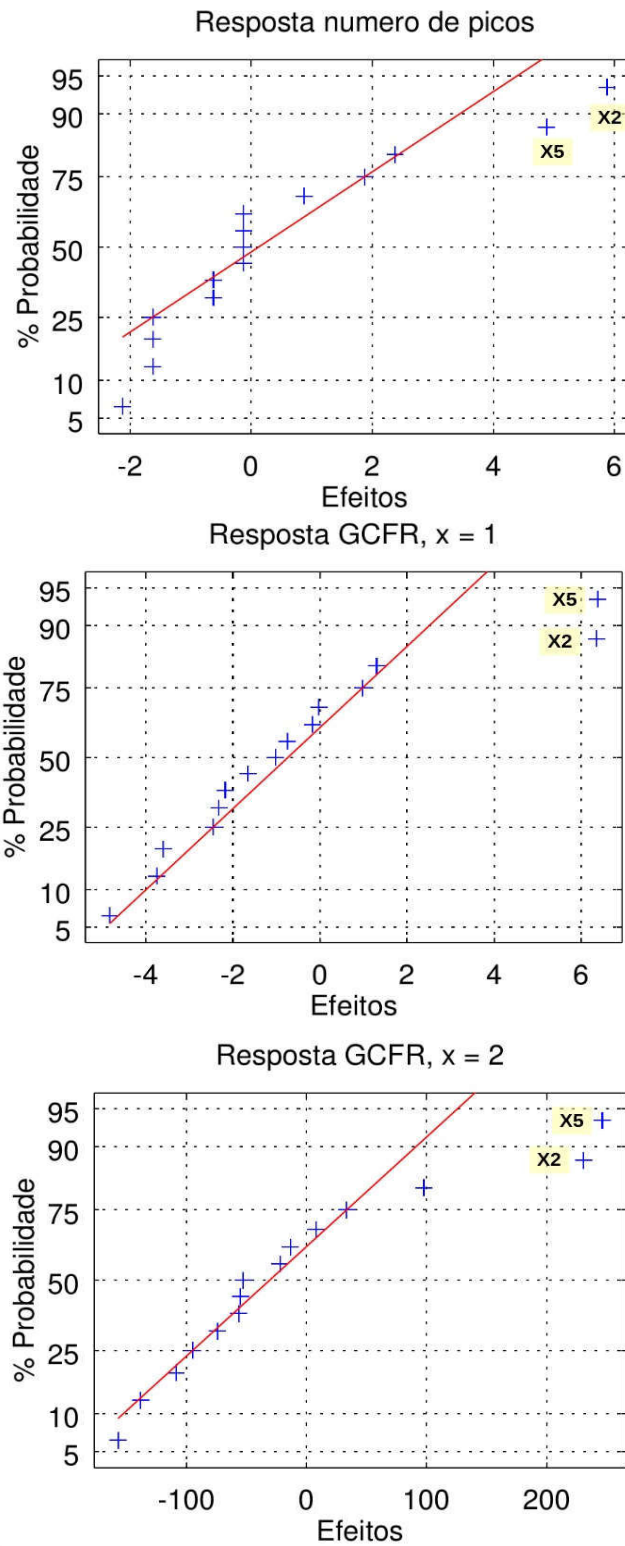


Continua figura 18.



Pelos dados obtidos, foi possível obter os gráficos de probabilidade normal de probabilidade para determinação das variáveis de maiores efeitos sobre a separação dos compostos do EHA das folhas de *T. catappa* (Figura 19).

Figura 19. Gráfico dos valores dos efeitos calculados para a resposta N° de bandas cromatográficas (picos), GCFR ($x=2$) e GCFR ($x=1$).



Analisando os gráficos acima, é possível observar que as variáveis X2 (% final de EtOH) e X5 (Vazão) foram as que apresentaram maiores efeitos em todas as respostas analisadas e, portanto, foram submetidas ao Planejamento do Composto Central.

As demais variáveis não identificadas nos gráficos (Figura 19), tiveram suas condições ótimas obtidas através dos experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário, porém, com a preocupação do impacto gerado pelo método, não foram especificamente aplicadas no planejamento do composto central.

4.2.3 Planejamento do Composto Central (CCD) do EHA das folhas de *T. catappa*.

Com a identificação de quais variáveis se mostraram mais importantes na separação dos metabólitos do extrato, deu-se prosseguimento no tratamento dos dados obtidos, dessa forma foi realizado o Planejamento do Composto Central (PCC) mantendo as variáveis identificadas anteriormente.

A Tabela 6 (seção 3.7.2) apresenta as condições empregadas nessa etapa e a combinação desses novos níveis resultou em 11 experimentos (Tabela 8 – seção 3.7.2).

Com a realização dos experimentos nas condições mostradas na tabela 17, foram obtidos os resultados conforme Tabela 17, com a presença de dois experimentos com valores de GCFR elevados

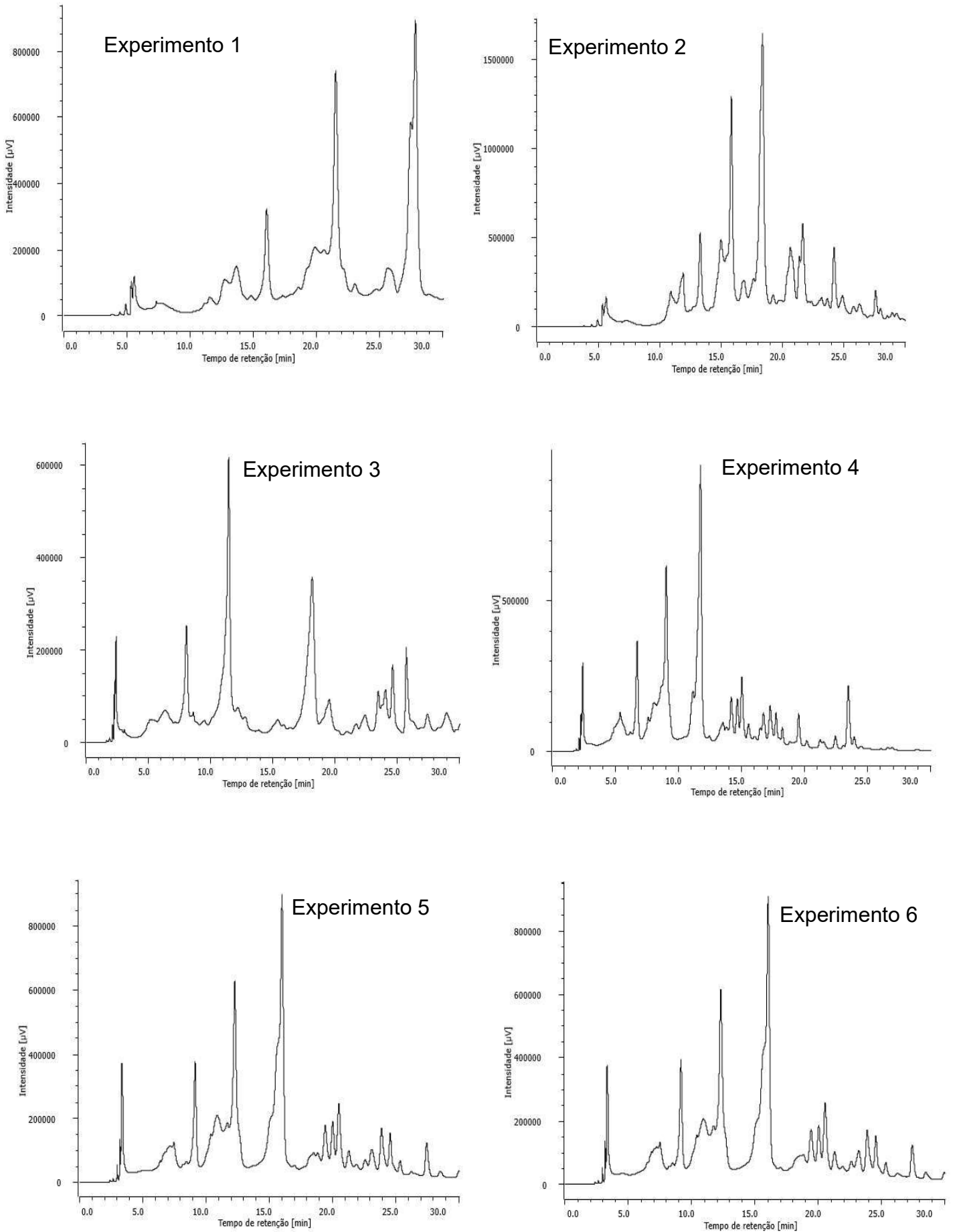
Tabela 17. Respostas obtidas dos cromatogramas do planejamento do composto central do EHA das folhas de *T. catappa*.

Exp.	X2	X3	Nº Bandas	GCFR	GCFR
				(X=1)	(X=2)
1	-1	-1	21	11,0	231,5
2	+1	-1	28	22,6	634,2
3	-1	+1	24	16,2	389,9
4	+1	+1	31	30,0	931,0
5	0	0	25	13,9	347,2
6	0	0	25	13,9	347,2
7	0	0	25	13,9	347,2
8	-1,41	0	16	5,1	81,9
9	0	-1.41	22	13,4	295,8
10	+1.41	0	32	23,4	747,3
11	0	+1.41	33	30,3	998,3

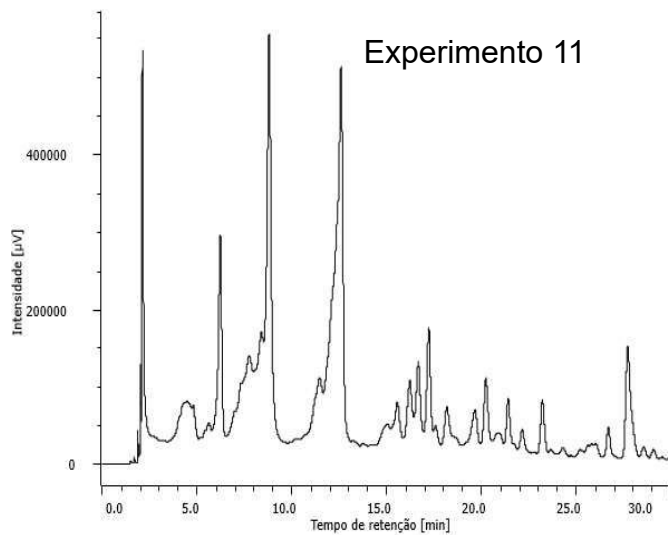
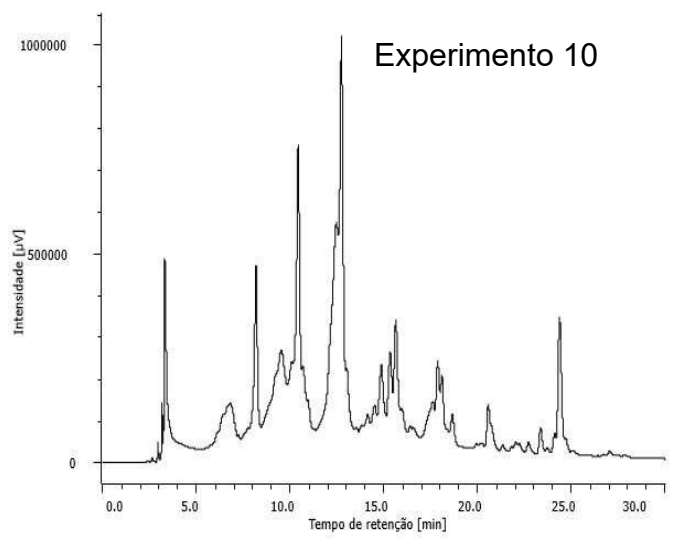
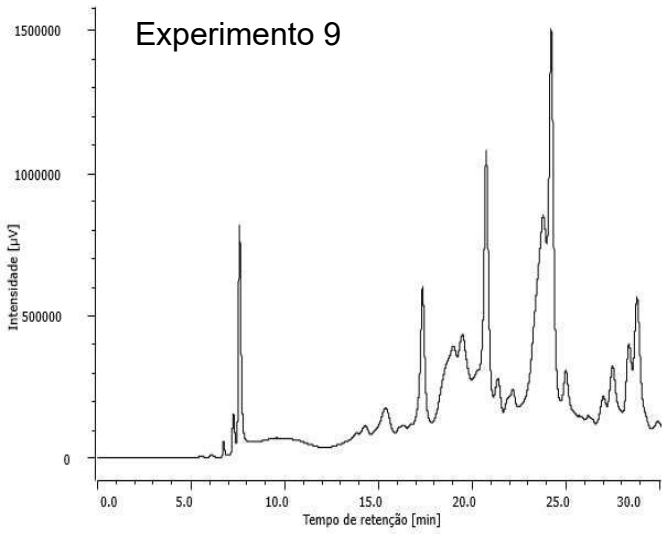
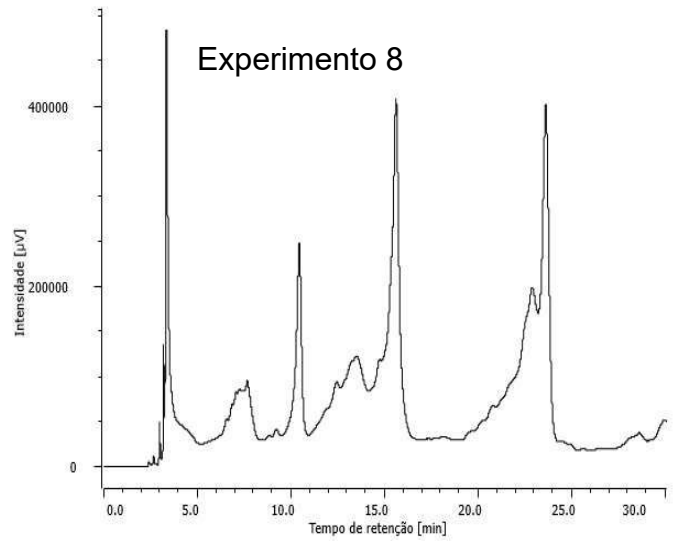
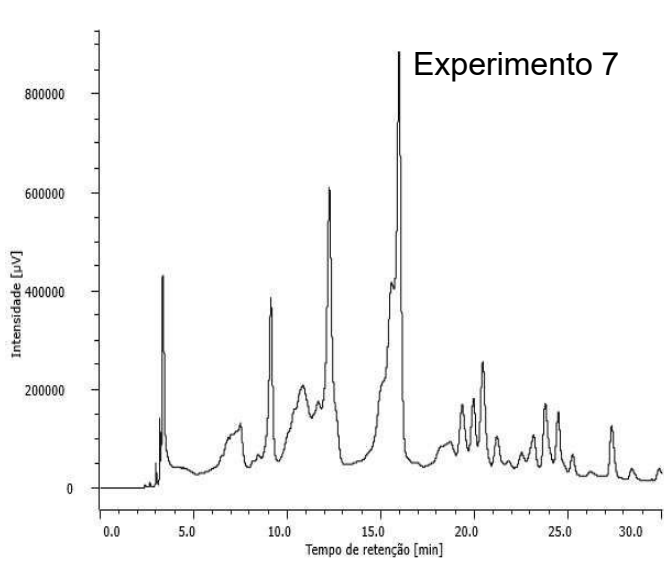
Nota: X2. %final de EtOH; X5. Vazão.

A Figura 20 representa as condições empregadas, relacionadas na Tabela 18.

Figura 20. Cromatogramas do planejamento do composto central.



Continuação figura 20.



Finalizado o tratamento dos dados obtidos e calculado a variância de cada resposta de número de bandas, GCFR (x=1), GCFR (x=2), obteve-se a tabela ANOVA (Tabelas 18, 19 e 20).

Tabela 18. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR (x=2).

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	845.047,79	5	169.009,56	22,88	5,05
Resíduo	36.941,31	8	7.388,26		
Total	881.989,10	10			
Erro Puro	0	2	0		
Falta de Ajustes	36.941,31	3	12.313,77	-	19,16
Varição Explicada	0,96	R	0,98		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Tabela 19. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para GCFR (x=1).

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	609,47	5	121,89	26,40	5,05
Resíduo	23,09	8	4,62		
Total	632,56	10			
Erro Puro	0	2	0		
Falta de Ajustes	23,09	3	7,70	-	19,16
Varição Explicada	0,96	R	0,98		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Tabela 20. Tabela da Análise de Variância (ANOVA) para nº de bandas cromatográficas.

Parâmetros	SQ	GL	MQ	Teste F	F tabelado
Regressão	239,51	5	47,90	11,39	5,05
Resíduo	21,03	8	4,21		
Total	260,55	10			
Erro Puro	0	2	0		
Falta de Ajustes	21,03	3	7,01	-	19,16
Varição Explicada	0,92	R	0,96		
Máxima variação explicável	1	R máximo	1		

Nota:SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; GL = Grau de Liberdade.

Analisando o conjunto de dados, verifica-se a ausência de erro puro (variabilidade intrínseca das análises), dessa forma, não podendo ser associado a isso a falta de ajuste presente no modelo. É possível observar também a falta de ajuste do modelo para essa espécie, comparando os valores do teste F tabela com o calculado, onde, o F calculado está abaixo do tabelado.

Apesar da variação explicada compreender valores próximo a 1 (onde 1 representa o máximo explicado), ainda assim, o resíduo é elevado, sendo esse outro fator determinante para avaliação da falta de ajuste, ou seja, a falta de otimização do método.

A falta de otimização do modelo pode ser explicada pela pouca variabilidade do número de bandas cromatográficas e conseqüentemente valores de GCFR.

Da mesma forma, a partir dos dados obtidos com os comparativos entre os planejamentos (triagem de variáveis e planejamento do composto central), foi possível a determinação das equações matemáticas das respostas avaliadas.

Equação 4. Modelo matemático do método desenvolvido, com base na resposta GCFR (x=2).

$$\text{GCFR (x=2): } 382,38_{(\pm 86,66)} + 235,95_{(\pm 72,98)} * X1 + 181,25_{(\pm 72,98)} * X2 + 143,59_{(\pm 83,30)} * X22$$

*X22 – representa a interação entre a variável X2= Vazão.

*X1 = % final EtOH.

Equação 5. Modelo matemático do método desenvolvido, com base na resposta GCFR (x=1).

$$\text{GCFR (X=1) = } 14,50_{(\pm 2,01)} + 6,41_{(\pm 1,69)} * X1 + 4,55_{(\pm 1,69)} * X2 + 4,30_{(\pm 1,93)} * X22$$

*X22 – representa a interação entre a variável X2= Vazão.

*X1 = % final EtOH.

Equação 6. Modelo matemático do método desenvolvido, com base na resposta GCFR (x=1).

$$\text{N}^\circ \text{ picos = } 24,59_{(\pm 1,83)} + 4,58_{(\pm 1,54)} * X1 + 2,70_{(\pm 1,54)} * X2$$

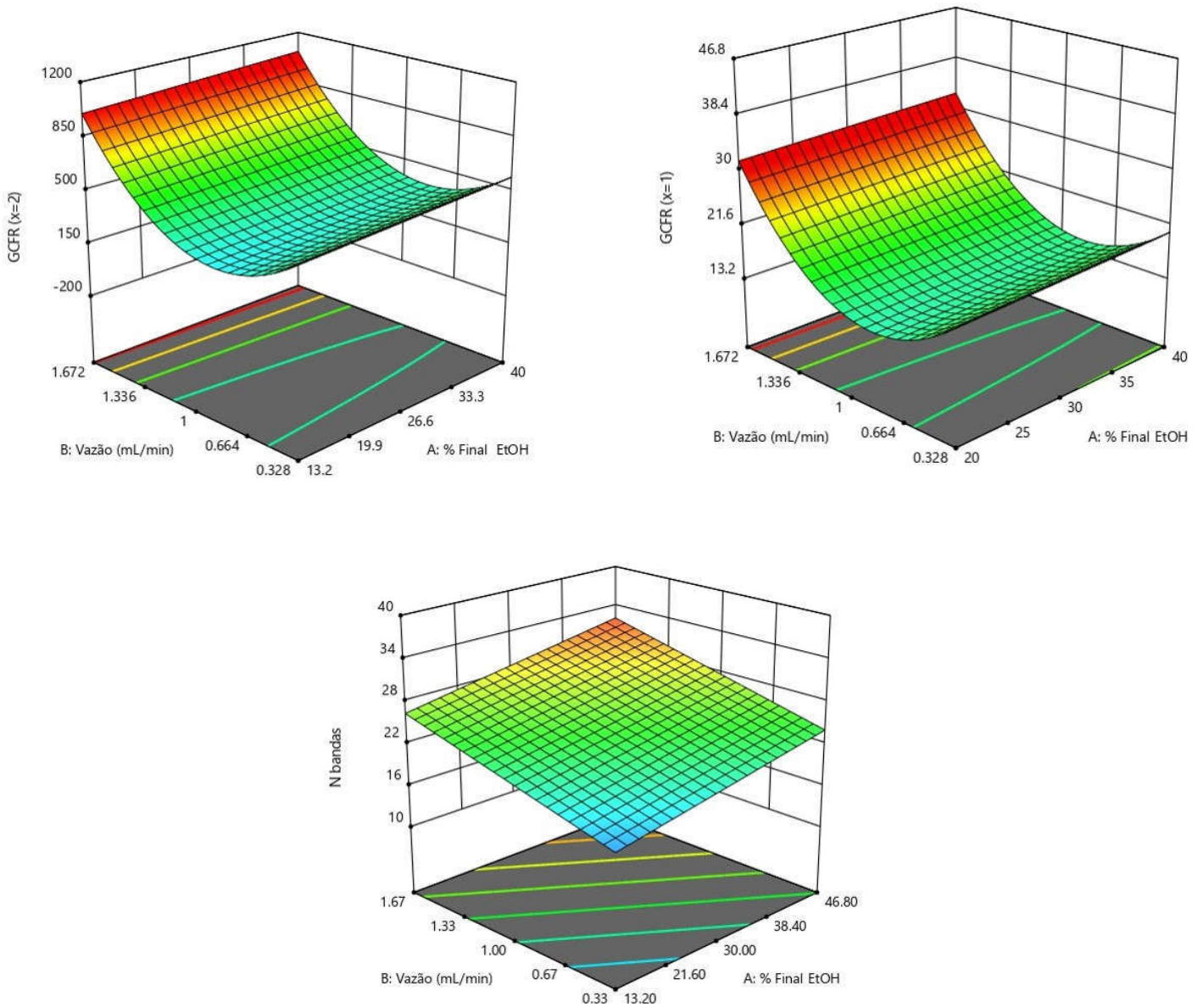
*X2 = Vazão.

*X1 = % final EtOH.

A partir das equações determinadas foram plotadas as superfícies de resposta (Figura 21), possibilitando obter as condições que maximizam as respostas avaliadas.

Condições obtidas nas duas regiões mais intensas no gráfico (vermelho) da resposta GCFR (x=2) e número de bandas cromatográficas

Figura 21. Gráfico com base no GCFR ($x=2$), GCFR ($x=1$) e número de bandas cromatográficas



Após análise das superfícies de reposta, foram obtidos três condições para o fator %final EtOH e uma condição para o fator vazão (Tabela 22).

Tabela 21. Condições obtidas a partir das superfícies de resposta.

Fatores	Condição 1	Condição 2	Condição 3
% inicial EtOH	5,0 %*	5,0 %*	5,0 %*
% final EtOH	14% **	29%**	45%**
Temperatura	30°C*	30°C*	30°C*
Vazão	1,64 mL/min**	1,64 mL/min**	1,64 mL/min**
% ác. Acético na água	0,1 %*	0,1 %*	0,1 %*

*Valores fixados no PCC;

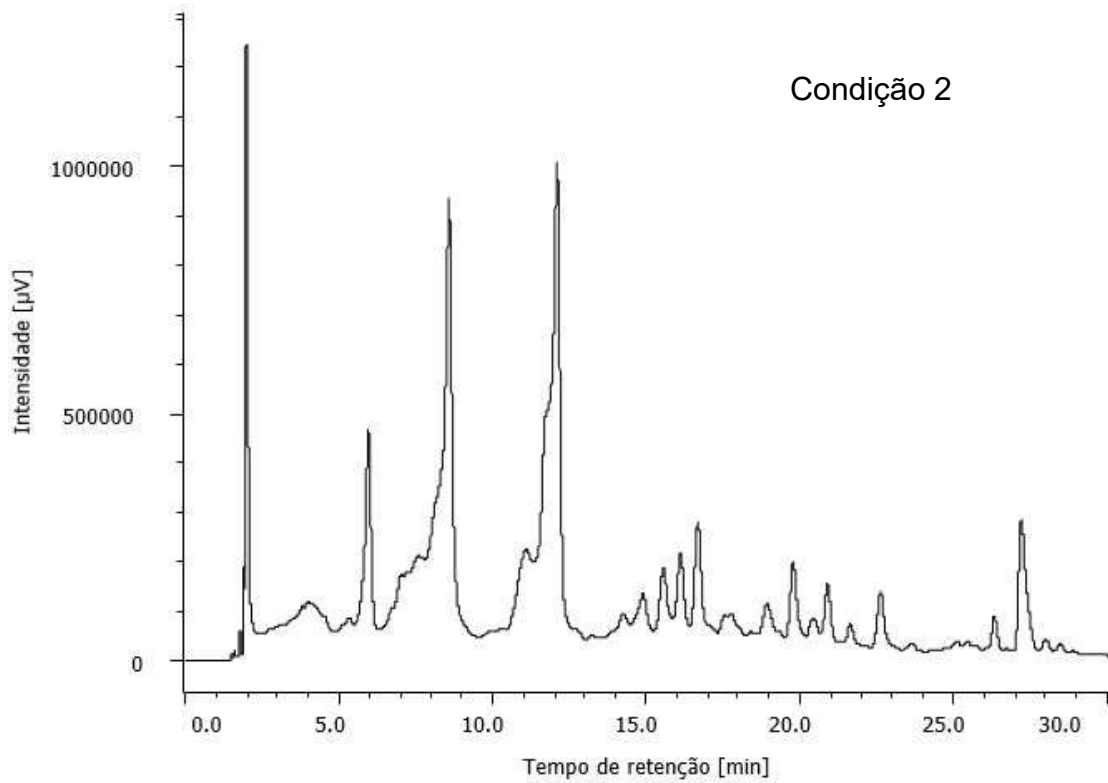
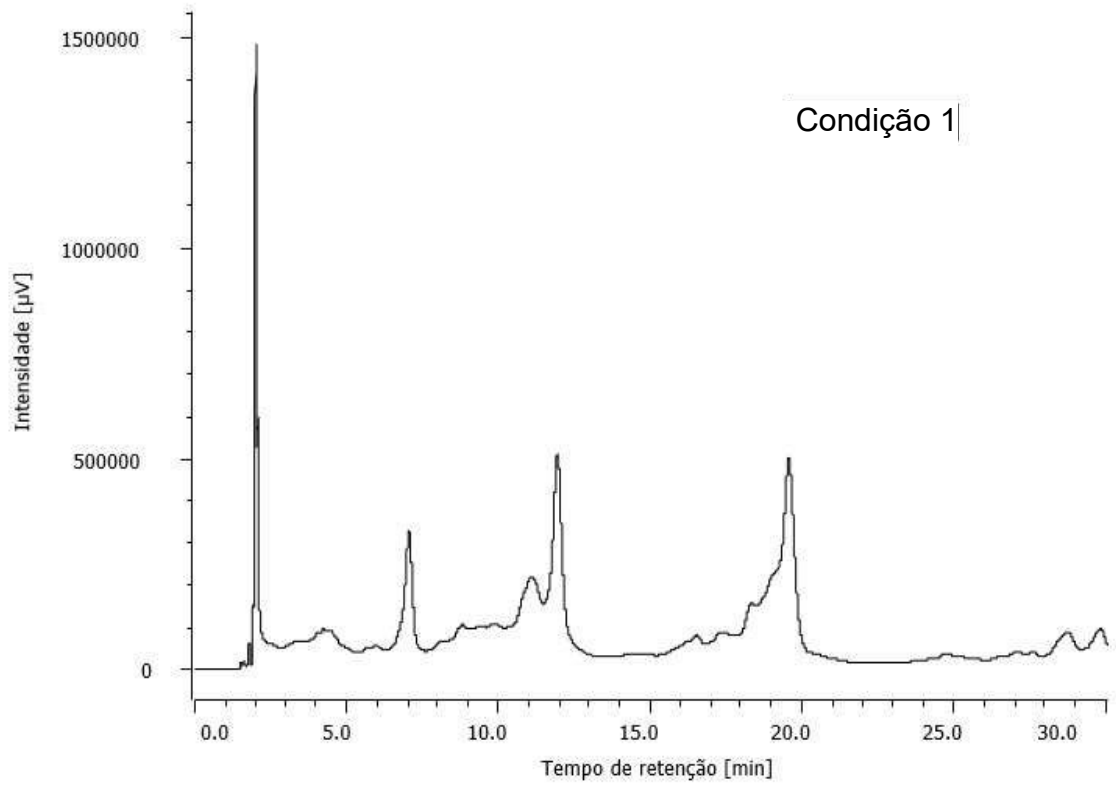
**Valores otimizados com os gráficos de superfície.

Como é possível observar na tabela 23, a condição 03 foi a que apresentou maiores respostas (número de bandas e GCFR) e menor tempo de análise (comparando a última banda cromatográfica em cada cromatograma), o que gera menores dispêndios de solventes e energia (Figura 22), sendo portanto a condição ótima para obtenção do perfil cromatográfico de *T. catappa*.

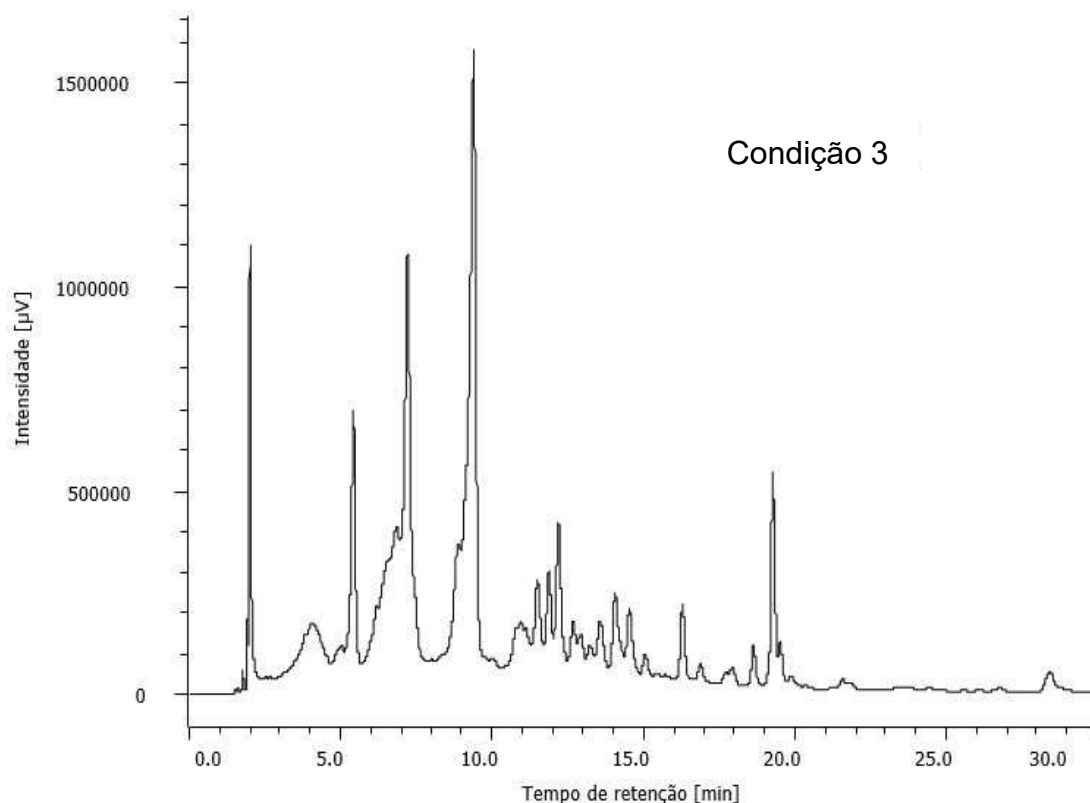
Tabela 22. Experimentos baseados nos gráficos de superfície de resposta.

Condição	Número de bandas	GCFR (x=1)	GCFR (x=2)
01	21	11	231,5
02	31	23,1	717,2
03	32	26,5	849,5

Figura 22. Cromatogramas das condições determinadas pelas superfícies de resposta.



Continuação figura 22.



4.3 Análise de precisão dos métodos desenvolvidos

Deve-se ressaltar que a avaliação da precisão dos métodos desenvolvidos é importante para elucidar a confiabilidade nos dados apresentados e devido à necessidade de verificação da qualidade do método em questão, examinando as possíveis fontes de variabilidade em uma ou em várias respostas do método, para que assim, possa ser aplicado com base nos objetivos desejados (ALAERTS et al, 2007; FUNARI et al., 2014; HEYDEN et al., 2001; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

Nesse procedimento específico foram avaliados a **repetibilidade**, que representa a concordância entre resultados de medições sucessivas do mesmo método, utilizando as mesmas condições de medição; **precisão instrumental**, que representa a dispersão dos resultados entre os experimentos independentes, utilizando uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões.

Para determinação do desvio padrão relativo (DPR) utilizou-se a equação 7. Utilizando a área total de bandas cromatográficas em cada cromatograma.

Equação 7. % desvio padrão relativo (%DPR).

$$\%DPR = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \right) * 100$$

Para a repetibilidade do método abordado para a espécie *B. Intermedia* foi obtido um valor de 1,76% de DPR, que, em se tratar de matriz complexa, esse valor representa um desvio baixo, com relação às áreas das bandas cromatográficas.

Para a precisão instrumental, foi seguido a determinação da ANVISA, onde é necessário a avaliação de no mínimo três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em triplicata, resultando em nove determinações, dessa forma englobando toda a gama analítica em estudo.

Os resultados estão expressos na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de % DPR para Precisão Instrumental

Experimento	Desvio Padrão	Média	% DPR
1*	397184	4091177	9,7
2*	461661	4037288	11,4
3*	629266	3764761	16,7
4**	442865	8952215	4,9
5**	376666	8675067	4,3
6**	425965	8761507	4,9
7***	1762578	16307878	10,8
8***	1252388	16009672	7,8
9***	1940229	15855758	12,2

* áreas baseadas na concentração de 5 mg/ml; **áreas baseadas na concentração de 10 mg/ml; *** áreas baseadas na concentração de 20 mg/ml

Os resultados obtidos se dão em relação a concentrações diferentes e análises em dias diferentes, obtendo dessa maneira a precisão instrumental. Levando isso em consideração ao análises os valores de DPR, não há discrepância tão pronunciada entre as áreas utilizadas, visto que, como há coeluição de bandas, acarretando aumento do erro ao se calcular a área referente a cada banda cromatográfica.

Para a *T. catappa* a repetibilidade apresentou valor de 5,35%, valor que relativamente baixo, quando analisado os cromatogramas dessa espécie, dado a quantidade de substancias presente em seu extrato, ocasionando sobreposição de

bandas, podendo ser a causa da maior área calculada pelo software, acarretando em maiores erros.

Os resultados para precisão instrumental estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24. Valores de % DPR para Precisão Instrumental

Experimento	Desvio Padrão	Média	%DPR
1*	6089380	56143092	10,8
2*	5498896	58142242	9,5
3*	14667238	51992732	28,2
4**	2750362	110719759	2,5
5**	3644332	112666632	3,2
6**	5593345	112685062	5,0
7***	8193915	225999700	3,6
8***	5433540	229564916	2,4
9***	3082597	228854402	1,3

* áreas baseadas na concentração de 5 mg/ml; **áreas baseadas na concentração de 10 mg/ml; *** áreas baseadas na concentração de 20 mg/ml.

Analisando a Tabela 24 é possível perceber valores mais elevados, que representam maior dispersão dos resultados, podendo ser justificado pelas áreas calculadas, acarretando maior erro nos cálculos posteriores. Outro fato que pode ser visualizado na tabela acima é que o valor do desvio diminui com o aumento da concentração da amostra. Fato que segundo Snyder,(2010) a concentração da amostra interfere na aparência, não somente na intensidade da banda cromatográfica, como também no tempo de retenção.

Os mesmos parâmetros foram calculados utilizando o tempo de retenção das bandas cromatográficas com maior intensidade.

Para repetibilidade para a *B. intermedia*, o DPR dos tempos de retenção foi de 0,67%, podendo ser classificado como bom, pois demonstra a similaridade dos tempos onde cada substância deixou a coluna cromatográfica.

Para as precisões instrumental e intermediária, foram utilizados o tempo de retenção das bandas selecionada, como descrito nas Tabelas 25, 26 e 27.

Tabela 25. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 1).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,09506	20,5689	0,5
2	0,14004	21,0489	0,7
3	0,15076	21,5344	0,7
4	0,0925	22,437	0,4
5	0,09662	22,8689	0,4

Tabela 26. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 2).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,06182	20,4375	0,3
2	0,03586	20,86	0,2
3	0,03505	21,345	0,2
4	0,03662	22,2938	0,2
5	0,0377	22,7175	0,2

Tabela 27. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 3).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,08162	20,4789	0,4
2	0,03708	20,9	0,2
3	0,03873	21,3833	0,2
4	0,3841	22,3	0,2
5	0,04062	22,7567	0,2

Analisando os dados referente ao tempo de retenção, fica evidente a baixa dispersão do resultados quando comparado com o valor obtido referente às áreas, deixando claro o erro propagado nos cálculos das áreas totais, e também demonstrando a precisão das análises.

De forma semelhante, para a repetibilidade para a método da *T. catappa*, apresentou valor de 1,79% de desvio para o tempo de retenção das bandas cromatográficas, que pode ser classificado como um valor baixo.

Para a precisão instrumental, os resultados aparecem nas Tabelas 28, 29 e 30.

Tabela 28. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 1).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,00601	1,99111	0,3
2	0,05725	5,19444	1,1
3	0,07172	6,83778	1,0
4	0,09579	9,14667	1,0
5	0,09203	11,8422	0,8
6	0,342	18,4211	1,9

Tabela 29. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 2).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,010929064	1,99222	0,5
2	0,053385391	5,14667	1,0
3	0,051099032	6,80111	0,8
4	0,109936851	9,08889	1,2
5	0,12715913	11,7622	1,1
6	0,170912583	18,4489	0,9

Tabela 30. Valores de % DPR para Precisão Instrumental para as bandas selecionadas (Dia 3).

Banda cromatográfica	Desvio Padrão	Média	%DPR
1	0,005	1,98333	0,3
2	0,030459445	5,21556	0,6
3	0,058404718	6,89111	0,8
4	0,04055175	9,23778	0,4
5	0,065277187	11,9411	0,5
6	0,096623554	18,8611	0,5

Observando os valores de DPR para esse método é possível afirmar que houve pouca variação entre os tempos de retenção de cada banda selecionada, não apresentando nenhuma dispersão significativa.

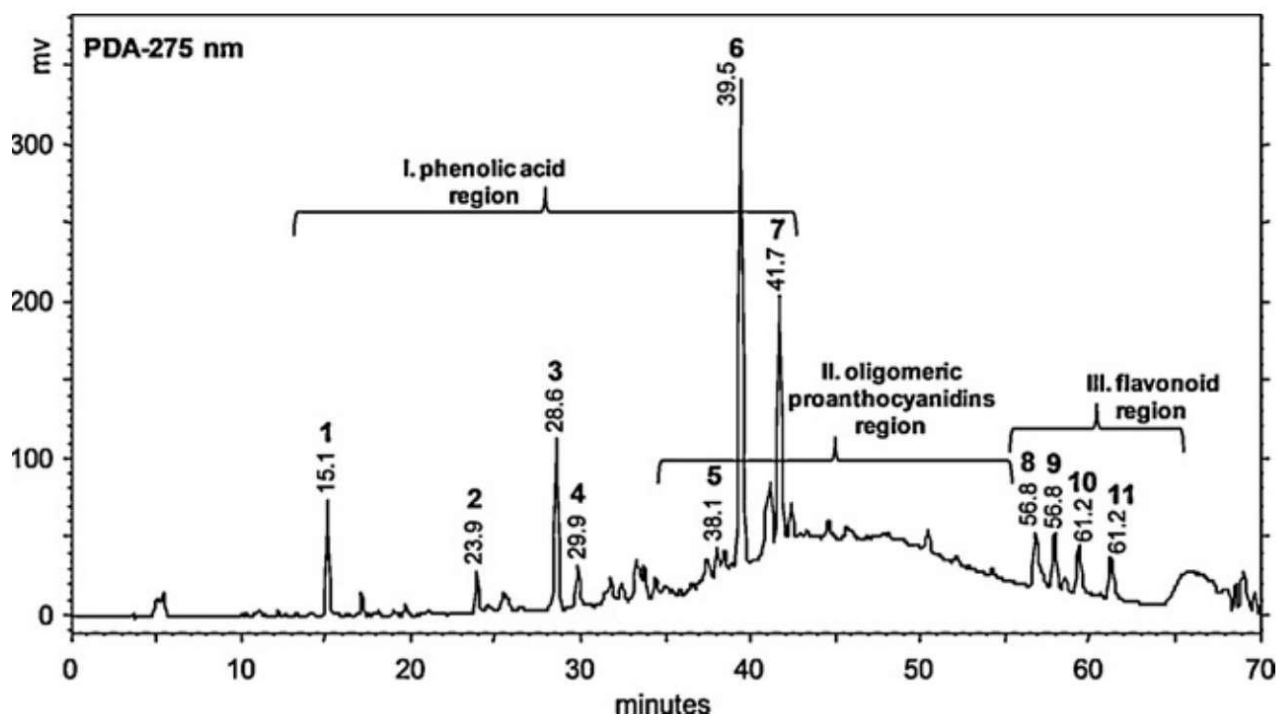
4.4 Comparativo entre os métodos de referência e os novos métodos desenvolvidos para obtenção dos perfis cromatográficos das espécies estudadas

4.4.1 *B. intermedia*

Santos et al. (2012) obtiveram o perfil cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *B. intermedia* (Figura 23), utilizando: fase móvel: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A), coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250x4,6 mm e 4 µm de diâmetro interno), vazão de 1 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; sistema de eluição de 0-20 % de B (20 min), 20 % de B (isocrático por 3 min), 20-50 % de B (37 min) e 50-100 % de B (5 min), totalizando 65 min.

Nesse trabalho, os autores relatam a identificação das bandas cromatográficas do perfil como sendo derivados do ácido gálico e derivados da quercetina.

Figura 23. Perfil cromatográfico de referência da espécie *B. Intermedia* (SANTOS et al., 2012). Identificação das bandas cromatográficas: (1) ácido gálico, (2) ácido 3,4-di-*O*-galoilquinico, (3) galato de metila, (4) catequina, (5) epicatequina, (6) ácido 1,3,5-tri-*O*-galoilquinico, (7) ácido 1,3,4,5-tetra-*O*-galoilquinico, (8) quercetina-3-*O*-β-galactopiranosideo, (9) quercetina-3-(2''-*O*-galoil)-*O*-β-galactopiranoside, (10) quercetina-3-*O*-α-arabinopiranosideo e (11) quercetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)-α-arabinopiranosideo.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

No perfil do método cromatográfico verde desenvolvido (Figura 24), foi possível identificar as principais bandas relacionadas no trabalho de Santos et al. (2012) por

comparação dos espectros UV e tempos de retenção com padrões autênticos, sendo elas: **(1)** ácido gálico, **(2)** ácido 1,3,5-tri-*O*-galoilquinico, **(3)** ácido 1,3,4,5-tetra-*O*-galoilquinico, **(4)** quercetina-3-(2''-*O*-galoil)-*O*- β -galactopiranosideo, **(5)** quercetina-3-*O*- β -galactopiranosideo, **(6)** quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosideo e **(7)** quercetina-3-(2''-*O*-galoil)- α -arabinopiranosideo (Figura 25).

Figura 24. Perfil cromatográfico verde desenvolvido para a espécie *B. Intermedia* e espectros UV das principais bandas cromatográficas.

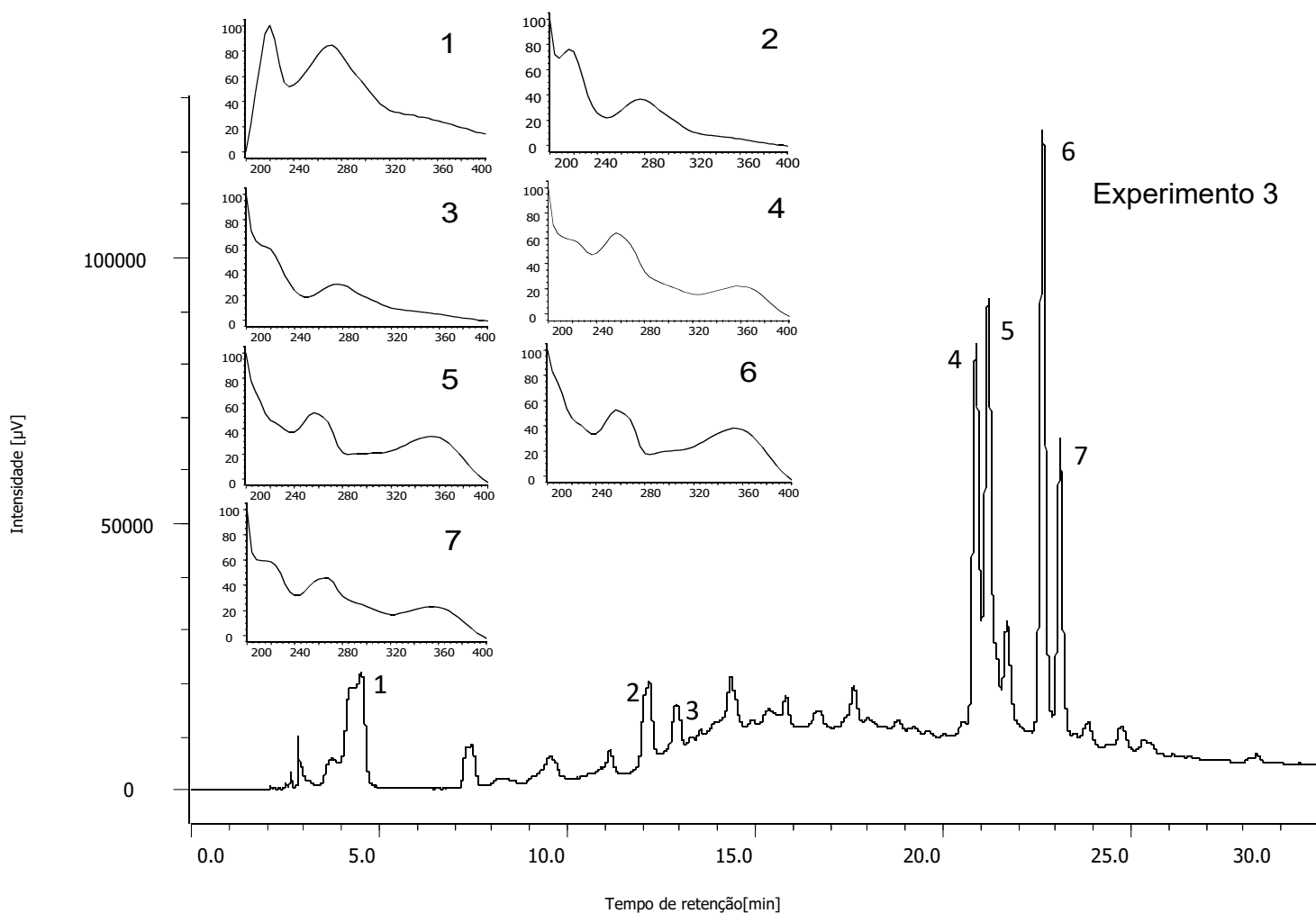
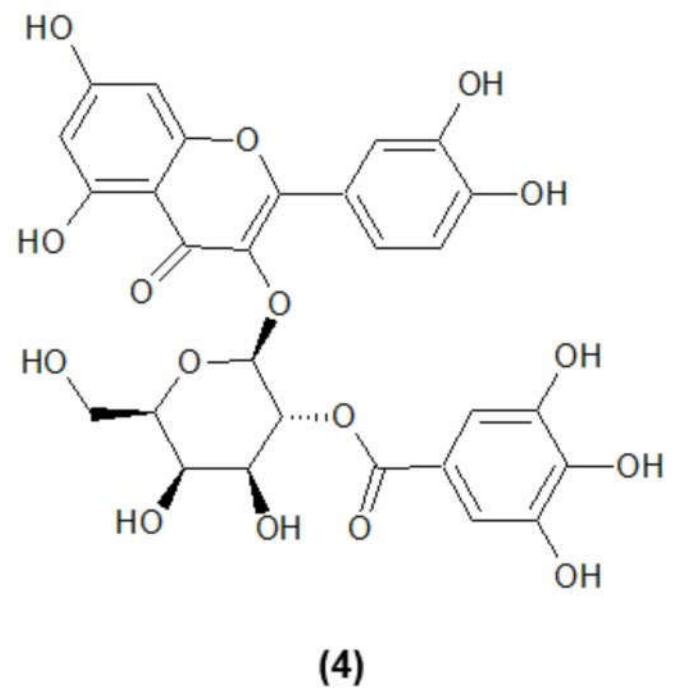
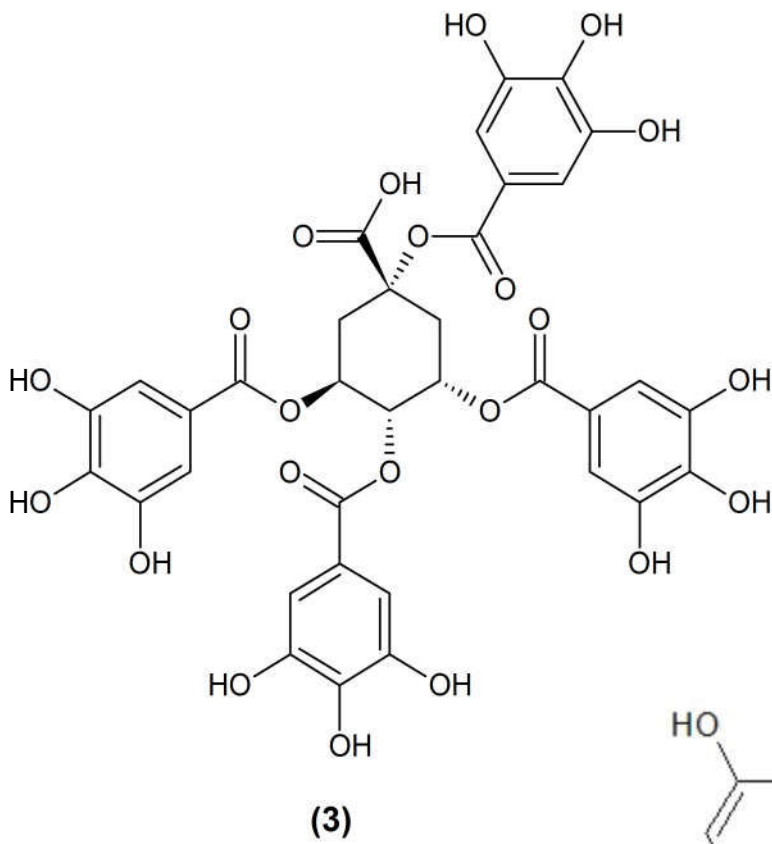
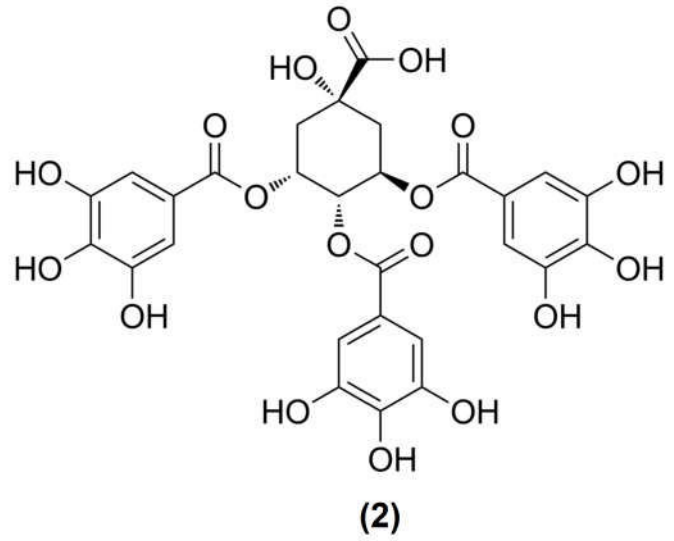
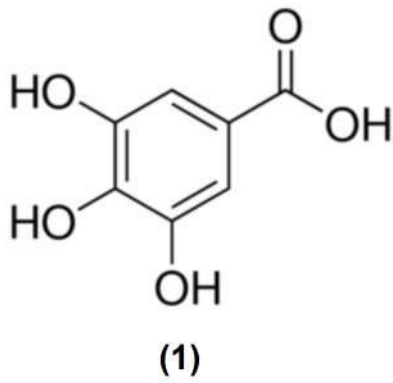
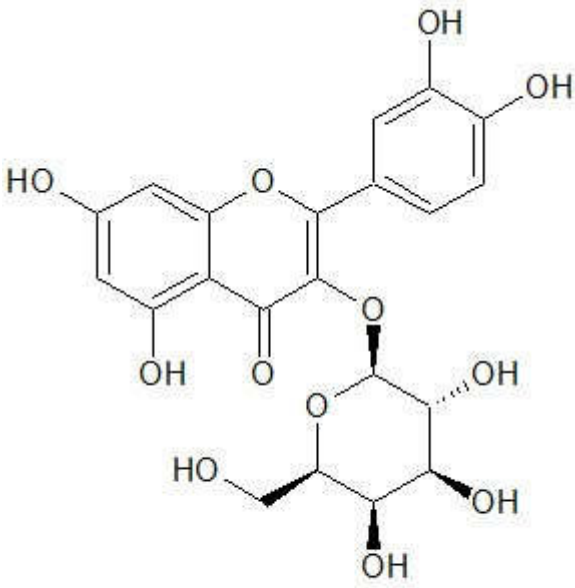


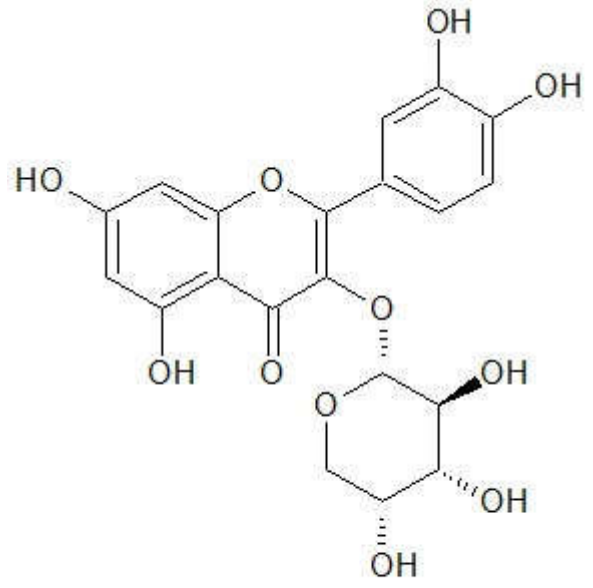
Figura 25. Estruturas das substâncias identificadas no perfil cromatográfico verde de *B. intermedia*.



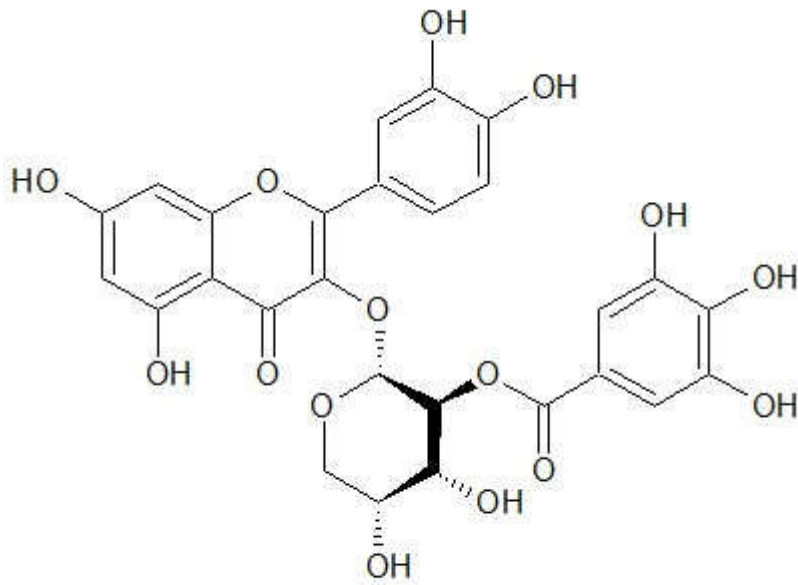
Continuação figura 25.



(5)



(6)



(7)

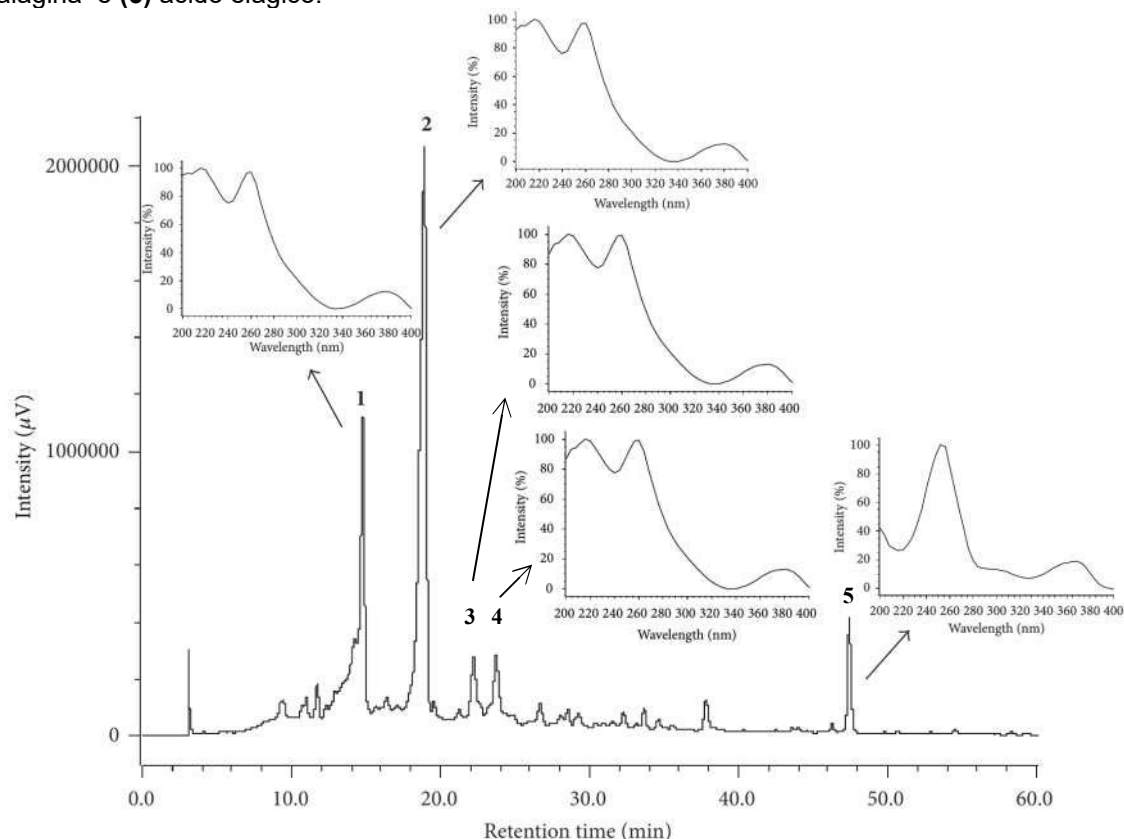
De acordo com a definição publicadas pela Anvisa (RDC 26 de 13 de maio de 2014), marcador é: “substâncias ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) utilizadas como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo”.

Portanto, o método cromatográfico verde desenvolvido para análise do extrato das folhas de *B. intermedia* possibilita a identificação inequívoca dos principais metabólitos secundários e, com isso, pode ser uma alternativa de baixo custo e impacto ambiental para realizar o controle de qualidade de extratos (e possível fitoterápico) dessa espécie.

4.1.2 *T. catappa*

Dentre os trabalhos publicados que envolvem o estudo de *T. catappa*, os dados publicados por Mininel et al. (2014a e 2014b) foram os que apresentaram os melhores perfis cromatográficos do extrato hidroalcoólico das folhas (Figura 26), em que os autores também relatam o isolamento e identificação dos cinco principais metabólitos secundários desse extrato: anômeros de punicalagina e punicalina, além do ácido elágico. As condições utilizadas pelos autores para a obtenção do perfil cromatográfico foram: fase móvel H₂O (A) e MeOH (B), gradiente de 5-50 % de B em 40 min e isocrático de 50 % de B por 20 min, totalizando 60 min de análise, vazão de 1 mL/min, coluna Synergi Hydro Phenomenex® RP18 (250 x 4,6 mm, 4 µm) e pré-coluna (4 x 3 mm, 5 µm).

Figura 26. Perfil cromatográfico de referência da espécie *T. catappa* (MININEL et al., 2014a; 2014b). Identificação das bandas cromatográficas: **(1 e 2)** anômeros α e β da punicalagina, **(3 e 4)** anômeros α e β da punicalagina e **(5)** ácido elágico.



Fonte: Adaptado de MININEL et al., 2014a e 2014b.

Assim como no perfil do método cromatográfico verde desenvolvido para *B. intermedia*, no perfil verde de *T. catappa* (Figura 27) também é possível identificar as principais bandas relacionadas no trabalho de referência (MININEL et al., 2014a; 2014b) por comparação dos espectros UV e tempos de retenção com padrões autênticos, sendo elas: **(1 e 2)** α e β – punicalagina, **(3 e 4)** α e β – punicalina, **(5)** rutina e **(6)** ácido elágico (banda 6) (Figura 28).

Embora o flavonoide rutina não tenha sido relatado por Mininel et al. (2014a; 2014b), esse flavonoide foi identificado no perfil cromatográfico verde e também foi isolado do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* por LIN et al. (2000).

Observando os perfis de referência e o verde, é possível notar que o perfil verde possui maior número de bandas cromatográficas. Portanto, o método desenvolvido mostrou-se melhor performance cromatográfica.

Figura 27. Perfil cromatográfico verde desenvolvido para *T. catappa* e espectros UV das principais bandas cromatográficas.

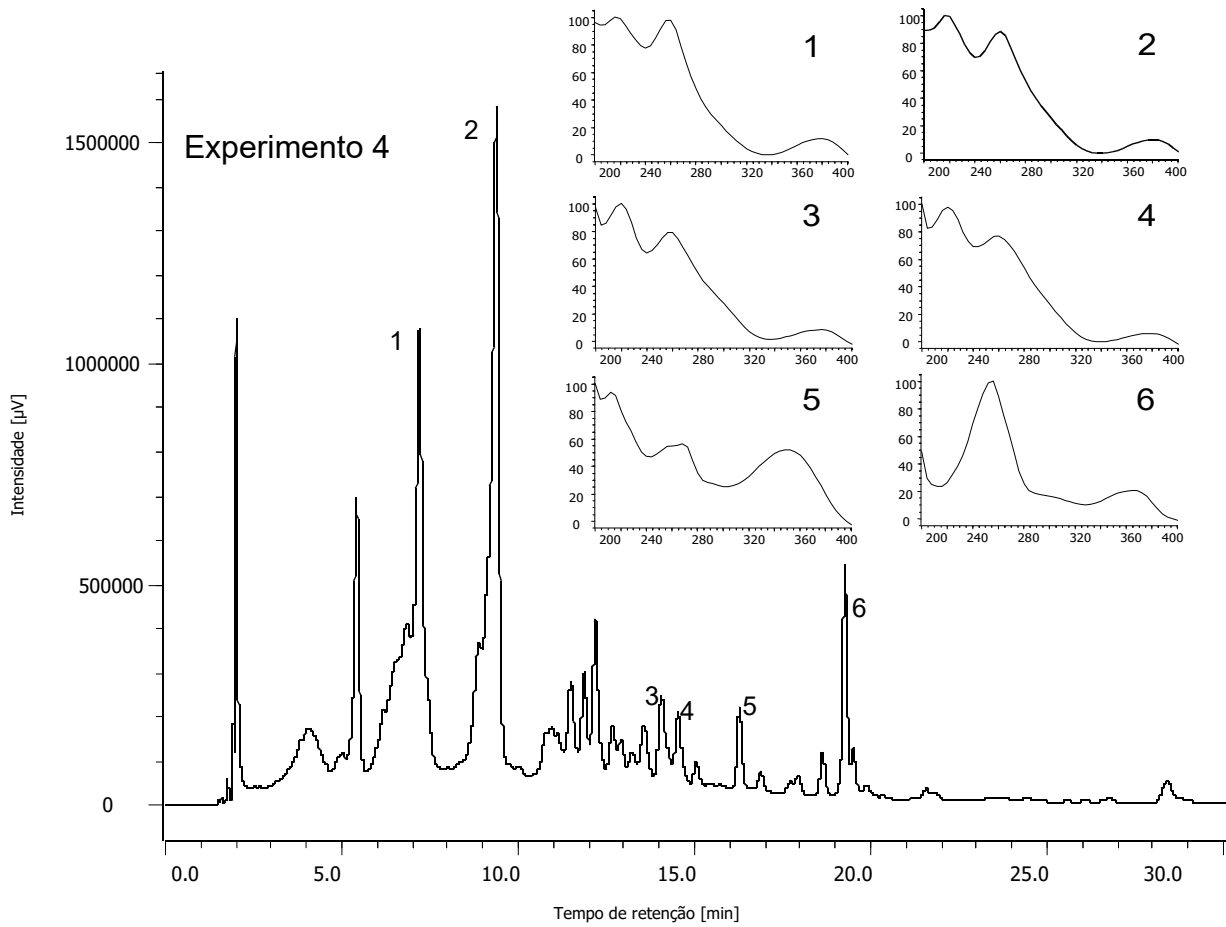
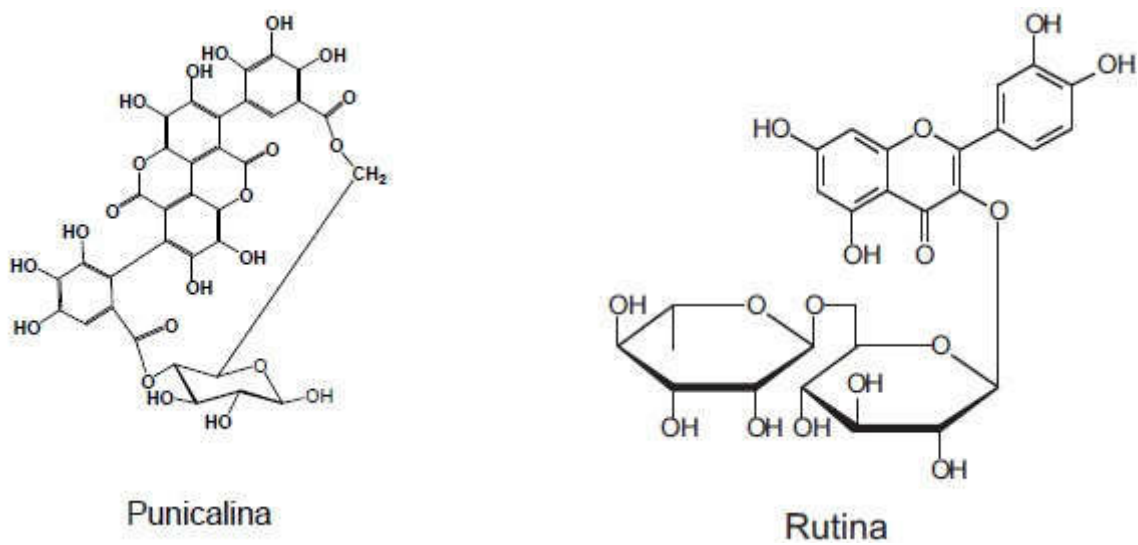
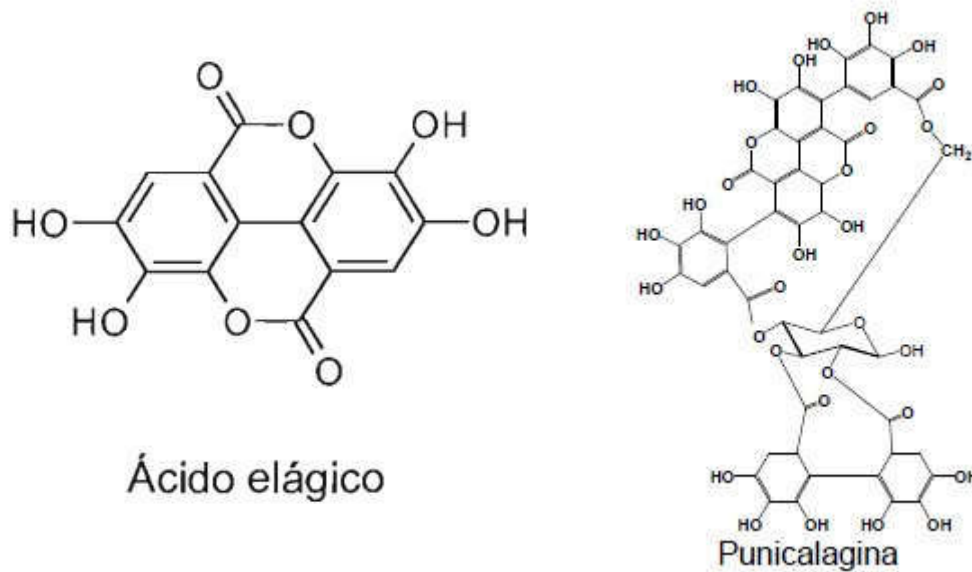


Figura 28. Estruturas das substâncias identificadas no perfil cromatográfico verde de *T. catappa*.



Continuação **figura 28**.



4.5 Aplicação da métrica HPLC-EAT.

O HPLC-EAT (*Environmental Assessment Tool*) é uma ferramenta de avaliação ambiental (Equação 8), distribuída gratuitamente, que visa quantificar o impacto ambiental de métodos cromatográficos (GABER et al., 2011).

Equação 8. Função HPLC-EAT.

$$HPLC - EAT = S1m1 + H1m1 + E1m1 + S2m2 + H2m2 + E2m2 + \dots + Snmn + Hnmn + Enmn$$

Os termos “S”, “H” e “E” são segurança, saúde e fatores ambientais, respectivamente, por “n” número de solventes com a massa “m” usados numa análise cromatográfica específica. Quanto menor é o valor de HPLC-EAT, menor é o impacto ambiental do método cromatográfico.

Com a utilização da métrica HPLC-EAT, foi quantificado o impacto ambiental entre os métodos desenvolvidos e os métodos de referência de *B. intermedia* (SANTOS et al., 2012) e *T. catappa* (MININEL et al., 2014a; 2014b). Os dois métodos desenvolvidos apresentaram *score* menor que os métodos de referência (Tabela 32).

Tabela 31. Comparação entre os valores obtidos pela função HPLC-EAT dos métodos desenvolvidos e dos métodos de referência de *B. intermedia* e *T. catappa*.

Espécie	score HPLC-EAT Método desenvolvido	score HPLC-EAT Método de Referência
<i>B. intermedia</i>	27,55	(SANTOS et al., 2012) 47,34
<i>T. catappa</i>	30,74	(MININEL et al., 2014a) 50,75

Como é possível observar (Tabela 33), os métodos desenvolvidos apresentaram *scores* aproximadamente duas vezes menor do que os métodos de referência. Nesse contexto, os métodos desenvolvidos apresentam um impacto ambiental menor. Isso pode ser explicado, principalmente, devido aos *scores* do EtOH serem relativamente favoráveis aos do metanol no que refere aos fatores segurança (S), saúde (H) e impacto ambiental (E) da métrica utilizada: enquanto o EtOH é considerado uma alternativa de menor impacto ambiental para ser utilizada em CLAE devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, o MeOH pode causar intoxicação através das vias respiratórias, digestivas e cutâneas (CARDOSO, 1995). Além disso, os métodos desenvolvidos com EtOH consumiram menor volume de solvente orgânico na fase móvel sendo 10,70 mL e 12,28 mL nos métodos de *B. intermedia* e *T. catappa*, respectivamente, enquanto que os métodos de referência dessas duas espécies consumiram 16,80 mL e 21,00 mL de MeOH, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Os métodos de *clean-up* desenvolvidos para os EHAs das folhas de *B. intermedia* e *T. catappa* mostraram-se simples, rápido e de baixo impacto ambiental, utilizando pequena quantidade de amostra e solventes/reagentes verdes.

Além disso, os métodos cromatográficos desenvolvidos foram eficientes e também apresentaram baixo impacto ambiental para obtenção do perfil cromatográfico (impressão digital ou *fingerprint*) do extrato hidroetanólico das folhas de *B. intermedia* e *T. catappa*.

Os métodos foram obtidos a partir de uma abordagem multiparamétrica e heurística, nas quais parâmetros de separação e ambientais foram considerados de modo simultâneo. Durante o processo de desenvolvimento dos *fingerprinting*, os experimentos foram rigorosamente selecionados e executados com EtOH, conhecido por sua baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Embora EtOH seja mais viscoso que MeOH (solvente empregado nos trabalhos comparados nas seções 4.1.3 e 4.2.3) os métodos mostraram-se compatíveis com equipamentos para CLAE comuns, com pressão abaixo de 400 bar, e com eficiência semelhante, no caso de *T. catappa* superior, aos trabalhos da literatura com os mesmos propósitos.

Os métodos verdes desenvolvidos são vantajosos em relação aos métodos da literatura porque possuem seletividade semelhante, permitindo identificar os principais constituintes, não geram riscos à saúde dos analistas na manipulação dos solventes e os resíduos gerados não necessitam de tratamento de alto custo. Esses benefícios são justificados pelo fato desses métodos utilizarem EtOH como solvente orgânico que possui baixa toxicidade, sua produção é sustentável (produzido a partir da cana-de-açúcar) e possui baixo custo no estado de São Paulo, principalmente na região de Araraquara e Bauru.

Portanto, a migração de métodos em CLAE poluidores por métodos mais “verdes” não requer grandes modificações na instrumentação em CLAE geralmente empregada, mas requer uma abordagem diferente no desenvolvimento do método, na qual o conceito de “performance cromatográfica” considere a separação cromatográfica em conjunto com aspectos ambientais.

Ainda, embora *B. intermedia* e *T. catappa* não estejam na Rénisus, elas são espécies que apresentam atividades farmacológicas promissoras e com isso, essas espécies possuem potenciais para produção de fitoterápicos. Em controles de qualidade de fitoterápicos realizam-se inúmeras análises de diversos lotes que podem gerar grande quantidades de resíduo. Esses métodos poderão contribuir para diminuição desses resíduos.

REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Brasília. 2017. 21 p.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**. v. 66, p.2388-2392, 2005.
- ALAERTS, G, et al. Recent Developments in Chromatographic Fingerprints from Herbal Products: Set-up and Data Analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 900-922, 2010.
- ALAERTS, G. et al. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: Ascreening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p. 01-08, 2007.
- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**. v. 31, p. 31-36, 2007.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Green chemistry. **Frontiers**, 1998.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.** v. 39, n. 1, p. 301-312. 2010.
- BASNET, P., et al. Hydroxymatteucinol, a new C-methyl flavanone derivative from *Matteucia orientalis* potent hypoglycemic activity in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, p. 1790–1795, 1993.
- BONZANI DA SILVA, J. ; β -Amyrin in roots of *Byrsonima intermdia*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 53-67, 1970b.
- BONZANI DA SILVA, J.; Gallic acid, pyrogallol, and pyrocatequine in *Byrsonina intermedia latifolia*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p.187-192, 1970a.
- BRASIL, RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 141, de 25 de julho de 2017.
- CALVO, N. L, Maggio, M. R. ; Kaufman, T. S. ; Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 538-564, 2017.
- CARDOSO, L. M. N. **Avaliação de Metodologia de coleta e análise de solventes/misturas de solventes no ar em ambiente de trabalho: “Metanol em mistura MEG”**. 1995. 14 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1995.

CARVALHO, M. A. F. **In vitro culture, cryopreservation and medicinal properties of *Byrsonima intermedia***. UFLA, 2010. 196p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASQUÍMICA. Ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) - Tetrahydrofuran, 2011. Disponível em: <<http://www.casquimica.com.br/fispq/thfcastraduzido.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2016.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para Análise de Microcistina Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 36, n.8, p.1208-1213, 2013.

CETESB. Ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) - Tetrahydrofuran, 2016. Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.aspconsulta=TETRAHIDROFURANO>. Acesso em: 19 set. 2016.

CHEN JH, LI TY, LIN TC. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannins component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer letters**, v.152, p. 115-122, 2000.

CHEN, Y. et al. *Ganoderma* species discrimination by dual-mode chromatographic fingerprinting: A study on stationary phase effects in hydrophilic interaction chromatography and reduction of sample misclassification rate by additional use of reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1255-1265, 2010.

FAN Y. M. et al. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 253-260. 2004.

FAN, X. H. et al. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**. v. 555, p. 217-224. 2006.

FELÍCIO, J. D. et al. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 62, p. 91-92, jan. /dez. 1995.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 239 p.

FILHO, E. R. P.; **Planejamento Fatorial em Química**. Única ed. São Carlos: EduFSCar, 2015.

FUNARI, C. S. et al. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**. v. 37, p. 37-44, 2014.

GABER, Y.; et al. (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2021-2025, 2011.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.50, p.78-84, 2013.

Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference on Harmonisation (ICH), 1996.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 01-93, Fev., 2006.

HECHT, S.M. ; et al. A strategy for identifying novel, mechanistically unique inhibitors of topoisomerase I. **Journal of Natural Products**. v. 55, p. 401–413, 1992.

HENDERSON, R. K. et al. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**. v. 13, p. 854-862, 2011.

HEYDEN, Y. V. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v, 24. p, 723-753, 2001.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH, 2005. Disponível em: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 09 Mai. 2018.

Ji, Y. B, et al. Developmente, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 97-104, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4.ed. São Paulo: Nacional, 1977, 778p.

KASHIWADA, Y., et al. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 487–492., 1993.

KONG, W.J. et al. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma Coptidischiensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methos. **Phytomedicine**, v. 16, p. 950-959, 2009.

LANÇAS, M.F. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetoneitrila em tempos de “crise” ?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n.1, p.51-60, 2009.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LI, Y. et al. An approach to develop binary chromatographic fingerprints of the total alkaloids from *Caulophyllum robustum* by high performance liquid chromatography/diode array detector and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Pahrmedical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1667-1672, 2007.

- LI, Y. et al. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 597-602, 2010.
- LIANG, X. et al. Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 565-571, 2010.
- LIN C. C.; HSU JM, UJIE T. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 27, p. 53-163, 1997.
- LIN, Y. L.; et al. **Flavonoid Glycosides from *Terminalia catappa* L.** Journal of the Chinese Society, v. 47, p. 253-256, 2000.
- LIRA, W. M. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*.** 2007. Tese (Doutorado em análises clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Araraquara/SP, 2007.
- LORENZI, H.; et al. **Árvores exóticas do Brasil**, Nova Odessa: Editora Plantarum. 2003. v. 1. 384p.
- MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARQUETE, N.F.S.; VALENTE, M.C. Combretaceae In: **M.C.M. Marques & H.F. Martins, Flora do Estado do Rio de Janeiro**. Albetoa, v. 4, p.13-51,1997.
- MARTINS, K. F.; Filho, J. B.; Determinação da frequência de micronúcleos outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.
- MASUDA, .T.; et al. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1749-54,1999.
- MICHELIN, D. C.; et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 690-695, dez. 2008.
- MININEL, F. J. et al. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2014, p. 1-11, 2014a.
- MININEL, F. J. et al. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 159, p. 285-295, 2014b.

- MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MOREIRA, L. Q. **Avaliação Química e Biológica da Espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss.** 2010. 162 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG, 2010.
- MOREIRA, R. C. T. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta. Farm. Bonaerense**. v. 21, n. 3, p. 205-211, 2002.
- NAMIEŚNIK, J. Trends in environmental analytics and monitoring, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.30, p. 221-269, 2000.
- NETO, B. B.; et al. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Revista Química Nova**, v. 29, nº 6, p. 1401-1406, 2006.
- NETO, J. O. et al. **Metodologia para tratamento de clorofórmio comercial para uso em separações cromatográficas.** Comunicado Técnico 164. Embrapa. 2010.
- OLIVEIRA, M.I.B.; et al. Sistema reprodutivo e polinização de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 756-758, jul. 2007.
- PIMENTEL, G. **Fruticultura brasileira.** São Paulo: Livraria Nobel, 2005. 448p.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169p.
- RATNASOORIYA, W. D; DHARMASIRI, M. G. 2000. Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behaviour and fertility of male rats. **Asian J Andro** 2: 213-219.
- RATNASOORIYA, W.D.; DHARMANSIRI, M.G. Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behaviour and fertility of male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 2, p. 209 -213, 2000.
- REIS, M.G.; FARIA, D. A.; SANTOS, I. A.; et al. Byrsonic acid – the clue to floral Mimicry Involving Oil-producing flowers and oil-collecting bees. **Journal of Chemical Ecology**. v. 33, n. 7, p. 1421-1429, 2007.
- RIBANI. M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, nº. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, D. A.; et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.
- RIBEIRO, J. S. et al. Prediction models for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics. **Talanta**. v.101, p. 253-260. 2010.
- RIBEIRO, F.A.L.; et al. Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química . Conselho Regional

de Química, IV Região, 2007. Disponível em:

<http://www.crq4.org.br/informativomat_235>. Acesso em 16 mai. 2018.

RODRIGUES, C. M. R. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. Leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 319-326. 2007.

SANTOS, R. C. **Avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênica e antidiarrêica dos extratos e partições obtidos a partir das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae)**. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu/SP. 2012.

SANTOS, S. L. D. X.; et al.; Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade rural do semiárido da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.93, n1, p 68-79, 2012.

SIGMA-ALDRICH. Ficha de dados de segurança – Acetonitrila 99,8% Anidra. Disponível em: <<http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Acetonitrila.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

SNYDER, R.L.. **Introduction to modern liquid chromatography**. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. 2010. 942 p.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M.T. Fruto e semente de *Byrsonima intermedia*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.697-712, out.-dez. 2005.

STACE, C. A. **Combretaceae:Flora Neotropica 107**. The New York Botanical Garden Press. New York. 2010. 369p.

TAN GT, PEZZULO JM, KINGHOM AD, HUGHES SH. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. **Journal of Natural Products**, v. 54, p.143-154, 1991.

TEÓFILO, R.F., FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29, n.2, p. 338-350, 2005.

TEOTIA, S.; SINGH, M. Hypoglycemic effect of *Prunus amygdalus* seeds in albino rabbits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, p. 295–296. 1997.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical Chemistry – theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v.39, p. 2869-2878, 2010.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical Chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 2869-2878, 2009.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**. v. 6, n. 6., p. 1713-1725. 2014.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) - Acetonitrila. 2016. Disponível em: < <http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Acetonitrila.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

WEI, H. et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schiandra sphenanthera*. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 97-104, 2010.

XIE, Y. et al. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 204-212, 2007.

YE, J. et al. Chemical fingerprinting of Luwei Dihuang Pill and simultaneous determination of its major bioactive constituents by HPLC coupled with multiple detections of DAD, ELSD and ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49. p. 638-645, 2009.

ZORZANELLI, B. C.; MURI, E. M. F.; Oxidação de Alcoóis em Química Verde. **Revista Virtual de Química**. v. 7, n. 2, p. 663-683, 2015.