

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIELLE BEZERRA DE SANTANA

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E VALIDAÇÃO  
DE MÉTODO UPLC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES DA  
*THUYA OCCIDENTALIS* (CUPRESSACEAE)**

Maceió

2019

DANIELLE BEZERRA DE SANTANA

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E VALIDAÇÃO  
DE MÉTODO UPLC-DAD PARA DETERMINAÇÃO FLAVONÓIDES DA *THUYA  
OCCIDENTALIS* (CUPRESSACEAE)**

Trabalho de conclusão do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas apresentado ao Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Coorientadora: Prof. Dra. Sâmia Andréia Souza da Silva

Maceió

2019

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S232c Santana, Danielle Bezerra de.  
Composição fitoquímica, atividade antioxidante e validação de método UPLC-DAD para determinação flavonóides da *Thuya occidentalis* (Cupressaceae) / Danielle Bezerra de Santana. – 2019.  
171 f. : il. color.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.  
Co-orientadora: Sâmia Andrícia Souza da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: F. 137-147.  
Apêndices: f. 148-171.

1. *Thuya occidentalis*. 2. Flavonóides. 3. Fenóis. 4. Antioxidantes.  
5. Compostos fitoquímicos. 6. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I. Título.

CDU: 615.1:581.19



Ata de Exame de defesa de dissertação

Aos **dezesete dias** do mês de **maio de 2019**, às nove horas, e trinta minutos, reuniu-se na Sala 204 do PPGCF/UFAL, a banca examinadora composta pelos docentes doutores, Ticiano Gomes do Nascimento, Sâmia Andrícia Souza da Silva, Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto e Rui Oliveira Macedo, para o exame de defesa da dissertação intitulada: "**Composição fitoquímica, atividade antioxidante e validação de método UPLC-DAD para determinação de flavonóides da *Thuya occidentalis* (Cupressaceae)**", elaborada pela mestranda **Danielle Bezerra de Santana**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento**, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 41 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 12:34 horas, os examinadores consideram a dissertação () **APROVADA** OU () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 12:36 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela Mestranda. **Maceió, 17 de maio de 2019**

**Presidente (Orientador):** Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento,

Ticiano Gomes do Nascimento

**Coorientadora:** Profa. Dra. Sâmia Andrícia Souza da Silva,

Sâmia Andrícia Souza da Silva

**Examinadora Interna:** Profa. Dra. Isabel Cristina Celerino de Moraes,

Isabel Cristina Celerino de Moraes

**Examinador Externo:** Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Rui Oliveira Macedo

**Mestranda:** Danielle Bezerra de Santana

Danielle Bezerra de Santana

## AGRADECIMENTO

Aos amigos pela presença nos momentos alegres e principalmente nos mais difíceis.

À minha Mãe, pela grande mulher que é e por se a melhor mãe do mundo.

Ao meu Pai, pelo apoio e por ser o melhor pai do mundo.

À Fátima por ser minha segunda mãe.

Ao meu irmão, por ser meu parceiro.

Ao Marcus e o David, meus amigos e irmãos de coração, presentes que Canadá me deu. Por estarem comigo apesar da distância e das longas ligações telefônicas. Vocês me fazem acreditar que não importa a quantidade de amigos que temos, pois se forem verdadeiros já podemos nos considerar pessoas afortunadas.

A Yasmin e ao Ezequiel pela ajuda e pelos momentos de descontração durante a elaboração desse trabalho.

Ao Mckenzie McCartney, pelo carinho, apoio e incentivo. E que apesar de não estar presente, contribuiu bastante para minha vida acadêmica e pessoal.

Ao Joe Kelly, por ter acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Ao Prof. Dr. Ted Lakowski, por ter me passado sua paixão pela pesquisa. E por mostrar que tudo é possível com a magia dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento por me orientar, pela ajuda e por ter acreditado em mim.

À Banca examinadora.

Às minhas colegas do Orlando e Valdemir que me deram apoio e ajudaram em meus experimentos.

## RESUMO

*Thuya occidentalis* é uma planta pertencente à família Cupressaceae, e que tem longo histórico de uso na medicina tradicional sendo usada para tratar diversas doenças. Atualmente é utilizada e comercializada como planta ornamental. Porém, muitos pesquisadores têm realizado estudos com a planta, em vista de potencial atividade biológica. O interesse por este vegetal está em seu amplo espectro de atividade biológica, pois tem evidenciado atividade antibacteriana, antipirética, antiviral, anticancerígena, antioxidante e outras. *Thuya* é um vegetal complexo, pois apresenta flavonóides, catequinas, terpenos, lignanas, esteroides e polissacarídeos em sua composição. Compostos fenólicos, como flavonóides, têm mostrado capacidade de sequestrar radicais livres e podem vir a ser utilizados para tratar doenças ocasionadas por espécies reativas de oxigênio. O objetivo deste estudo foi caracterizar extrato hidro alcoólico de *Thuya occidentalis* usando ensaios fitoquímicos, atividade antioxidante, métodos de ensaios químicos e método UPLC-DAD para identificação e quantificação de flavonóides no extrato hidro alcoólico de *Thuya occidentalis*. Neste estudo, analisamos também a composição fitoquímica (Triagem fitoquímica), determinação de fenóis totais (Folin-Ciocalteu), flavonóides totais (Cloreto de Alumínio) e a atividade antioxidante (DPPH e FRAP), bem como identificação e quantificação de flavonóides usando UPLC-DAD. A validação do método UPLC-DAD ocorreu de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA e ICH, como: seletividade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e adequação do sistema. Os resultados evidenciaram a presença de flavonas, flavononóis, flavonóis, xantonas, catequinas e esteroides. Além disso, *Thuya occidentalis* possui 2,85% de fenóis totais e 0,95% de flavonóis em sua composição pelos métodos espectrofotométricos. Apresentou máxima atividade antioxidante de 95,12% em concentração de 200µg/mL do extrato hidro alcoólico com IC<sub>50</sub> de 5,647 µg/mL pelo método DPPH e 5,269 mM de extrato de *Thuya occidentalis* é necessário para reduzir 50% do reagente de FRAP. O método cromatográfico permitiu identificar flavonóides presentes na amostra, entre eles myricitrina, quercitrina, amentoflavona e Catequina, o que indica que o UPLC-DAD é mais preciso e confiável que os métodos convencionais para a quantificação de flavonóides na *Thuya*. O método UPLC-DAD foi validado, seguindo os parâmetros da ANVISA e da ICH e provou ser linear, seletivo, sensível, preciso e exato para a análise do extrato de *Thuya occidentalis* e flavonóides relacionados. Este método pode ser aplicado no controle de qualidade de extratos e composições farmacêuticas de *Thuya occidentalis*, utilizando os flavonóides como marcadores, uma vez que pode ser o responsável pelas propriedades terapêuticas desta planta.

Palavras-chave: *Thuya occidentalis*, flavonóides, fenóis totais, antioxidante, Triagem fitoquímica, Métodos UPLC-DAD.

## ABSTRACT

*Thuja occidentalis* is a plant from Cupressaceae family with a long history of use on traditional medicine being used to treat various diseases. It is currently used and sold as an ornamental plant. However, many researchers have conducted studies with the plant in due to its potential biological activity. The interest for this vegetable is in its broad aspect of biological activity, as it has evidenced antibacterial, antipyretic, antiviral, anticancer, antioxidant and other activities. Thuja is a complex plant, because it presents flavonoids, catechins, terpenes, lignans, steroids and polysaccharides in its composition. Phenolic compounds, such as flavonoids, have shown ability to scavenging free radicals and may be used to treat diseases caused by reactive oxygen species. The objective of this study was to determine the hydro alcoholic extract of *Thuja occidentalis*, using phytochemical assays, antioxidant activity, chemical assays and UPLC-DAD method for the identification and quantification of flavonoids in *Thuja occidentalis* hydro alcoholic extract. In this study, we also analysed the phytochemical composition (phytochemical screening), the antioxidant activity (DPPH and FRAP), quantified the total phenols (Folin-Ciocalteu), total flavonoids (Aluminium Chloride) and identification and quantification of flavonoids through UPLC-DAD. The validation of the UPLC-DAD method was performed according to the parameters established by ANVISA and ICH, such as linearity, precision, accuracy, recovery, robustness, selectivity, detection limit, quantification limit and system suitability. The results evidenced the presence of flavones, flavononols, flavonols, xanthenes, catechins and steroids. In addition, *Thuja occidentalis* has 2.85% of total phenols and 0.95% of flavonols in its composition. Maximum antioxidant activity of 95.125% with a concentration of 200 µg/mL of hydro alcoholic extract and IC<sub>50</sub> of 5.647 µg/mL by the DPPH method and 5,269 mM of *Thuja occidentalis* extract is required to reduce 50% of the FRAP reagent. The chromatographic method allowed to identify flavonoids present in the sample, among them: myricitrin quercitrin, amentoflavone e Catechin, indicating that the UPLC-DAD is more accurate and reliable than conventional methods for the quantification of flavonoids in Thuja. The UPLC-DAD method was validated, following the ANVISA and ICH parameters and proved to be selective, sensitive, linear, accurate and accurate for the analysis of the extract of *Thuja occidentalis* and related flavonoids. This method can be applied to the quality control of *Thuja occidentalis* extract and pharmaceuticals formulations, using flavonoids as markers, since it may be responsible for the therapeutic properties of this plant

Key-words: *Thuja occidentalis*, flavonoids, total phenols, antioxidant, phytochemistry screening, UPLC-DAD Method.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ramo de <i>Thuya occidentalis</i> .....	21
Figura 2. Redução do oxigênio até a formação de água, com seus respectivos EROs intermediários formados no processo.....	30
Figura 3. Categorias de antioxidantes naturais .....	31
Figura 4. Estrutura básica dos Flavonóides.....	33
Figura 5. Estrutura química dos principais Flavonóides.....	34
Figura 6. Reação de redução do DPPH a DPPH-H.....	43
Figura 7. Redução do complexo TPTZ com $Fe^{3+}$ .....	45
Figura 8. Reação do ácido gálico com o RFC.....	47
Figura 9. Reação de oxidação da Resazurina.....	50
Figura 10. Sistema de UPLC.....	53
Figura 11. Exsicata da <i>Thuya occidentalis</i> .....	71
Figura 12. Triagem Fitoquímica .....	77
Figura 13. Esquema visual da metodologia de FRAP.....	81
Figura 14. Resultados do tubo 6 e 7, respectivamente.....	91
Figura 15. Resultado do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> após a reação de Redução do Reagente FRAP.....	101
Figura 16. Estrutura de Flavonóides e suas respectivas hidroxilas.....	105
Figura 17. Perfil cromatográfico da mistura padrões analíticos na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (A) e extrato de <i>Thuya occidentalis</i> na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ . (B) a 310 nm. Os flavonóides (1) Catequina, (2) Myricitrina, (3) Rutina, (4) Quercitrina e (5) Amentoflavona foram identificados por meio de espectrômetro DAD-UV-Vis ao comparar com os padrões analíticos nas mesmas condições cromatográficas.....	111
Figura 18. Estrutura dos flavonóides identificados por UPLC-DAD .....	112



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da Triagem Fitoquímica .....	91
Tabela 2. Constituintes analisados na Triagem Fitoquímica da <i>Thuya occidentalis</i> .....	92
Tabela 3. Determinação de conteúdo de flavonóides totais e fenóis totais no extrato de <i>Thuya occidentalis</i> .....	96
Tabela 4. Atividade antioxidante do Extrato de <i>Thuya occidentalis</i> e do Trolox por DPPH .....	97
Tabela 5. Resultado das absorvâncias do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> por FRAP .....	102
Tabela 6. Atividade antimicobiana das frações do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> pelo método de microdiluição.....	107
Tabela 7. Determinação da regressão linear LQ e LD dos flavonóides de <i>Thuya occidentalis</i> .....	114
Tabela 8. Resultados de precisão e exatidão do método UPLC-DAD pelo método da calibração externa.....	127
Tabela 9. Resultados de precisão e exatidão do método UPLC-DAD pelo método de adição do padrão. ....	128
Tabela 10. Determinação dos parâmetros de robustez durante a validação do método UPLC-DAD para os flavonóides de <i>Thuya occidentalis</i> , pelo método da calibração externa.....	130
Tabela 11. Determinação dos parâmetros de robustez durante a validação do método UPLC-DAD para os flavonóides de <i>Thuya occidentalis</i> , pelo método da adição do padrão. ....	131
Tabela 12. Quantificação de flavonóides pelo método da calibração externa nas formulações contendo <i>Thuja occidentalis</i> .....	132
Tabela 13. Quantificação de flavonóides pelo método de adição do padrão nas formulações contendo <i>Thuja occidentalis</i> .....	133
Tabela 14. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 3) pelo método da adição do padrão.....	150
Tabela 15. Precisão e Exatidão inter-dia da catequina pelo método da adição do padrão. ....	151
Tabela 16. Precisão e Exatidão inter-dia da catequina pelo método da calibração externa. ....	151

Tabela 17. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 1) pelo método da calibração padrão.....	152
Tabela 18. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 2) pelo método da calibração externa.....	152
Tabela 19. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 3) pelo método da calibração externa.....	153
Tabela 20. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 1) pelo método da adição do padrão.....	154
Tabela 21. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 2) pelo método da adição do padrão.....	155
Tabela 22. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 3) pelo método da adição do padrão.....	156
Tabela 23. Precisão e Exatidão inter-dia da Quercetrina pelo método da adição do padrão. .....	157
Tabela 24. Precisão e Exatidão inter-dia da Quercetrina pelo método da calibração externa.....	157
Tabela 25. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 1) pelo método da calibração externa.....	158
Tabela 26. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 2) pelo método da calibração externa.....	158
Tabela 27. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 3) pelo método da calibração externa.....	159
Tabela 28. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 1) pelo método da adição do padrão.....	160
Tabela 29. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 2) pelo método da adição do padrão.....	161
Tabela 30. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 3) pelo método da adição do padrão.....	162
Tabela 31. Precisão e Exatidão inter-dia da Myricitrina pelo método da adição do padrão. .....	163
Tabela 32. Precisão e Exatidão inter-dia da Myricitrina pelo método da calibração externa. .....	163

Tabela 33. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 1) pelo método da calibração externa.....	164
Tabela 34. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 2) pelo método da calibração externa.....	164
Tabela 35. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 3) pelo método da calibração externa.....	165
Tabela 36. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia 3) pelo método da Calibração externa.....	171

## LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Curva de Calibração da Quercetina. ....	95
Gráfico 2. Curva de calibração do ácido gálico .....	95
Gráfico 3. Curva de absorbância do radical DPPH % do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> ...	98
Gráfico 4. Curva de absorbância do radical DPPH % da substância de referência Trolox	99
Gráfico 5. Capacidade de redução do radical DPPH do Trolox e do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> .....	100
Gráfico 6. Curva de calibração do Sulfato ferroso.....	102
Gráfico 7. Atividade antioxidante do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> por FRAP .....	103
Gráfico 8. Viabilidade celular de linfócitos tratados com extrato de <i>Thuja occidentalis</i> usando pelo tese da Resazurina.....	106
Gráfico 9. Curva de Calibração dos padrões de flavonóides pelo método da calibração externa (A) e adição do padrão (B) .....	115
Gráfico 10. Curva de calibração dos padrões de flavonóides pelos métodos da calibração externa e da adição de padrão. ....	116
Gráfico 11. Linearidade do flavonóide catequina e suas respectivas bandas de confiança e previsão. ....	118
Gráfico 12. Análise de Resíduos do flavonóide Catequina.....	119
Gráfico 13. Linearidade do flavonóide Quercitrina e suas respectivas bandas de confiança e previsão. ....	120
Gráfico 14. Análise de Resíduos do flavonóide Quercitrina.....	121
Gráfico 15. Linearidade do flavonóide Myricitrina e suas respectivas bandas de confiança e previsão. ....	122
Gráfico 16. Análise de Resíduos do flavonóide Myricitrina .....	123
Gráfico 17. Linearidade do flavonóide Amentoflavona e suas respectivas bandas de confiança e previsão. ....	124
Gráfico 18. Análise de Resíduos do flavonóide amentoflavona. ....	125
Gráfico 19. Precisão das Amostras de Controle de qualidade, pelos métodos de calibração externa e adição de padrão. (A) Myricitrin, (B) Catequina, (C) Quercetrina e (D) Amentoflavona.....	129

Gráfico 20. Concentração dos flavonóides catequina e quercitrina em formulações contendo *Thuja occidentalis*, pelo método da calibração externa(A) e adição do padrão (B) ..... 134

Gráfico 21. Concentração dos flavonóides myricitrina e amentoflavona em formulações contendo *Thuja occidentalis*, pelo método da calibração externa(A) e adição do padrão (B). ..... 135

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação da reta do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> por FRAP .....	82
Equação 2. Resultado final (Z).....	82

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Lista dos fitoquímicos presentes no extrato de <i>Thuya occidentalis</i> .....	23
<b>Quadro 2.</b> Ensaio de identificação para <i>Thuya occidentalis</i> .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AKR1B10	Família Aldo-Keto Redutase 1 Membro B10
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD4	Célula de diferenciação
CD8	Célula de diferenciação
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COX	Ciclo-oxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPPH-H	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EMEA	Agência Europeia de Medicamentos
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FASN	Ácido graxo sintase
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato ferroso
FRAP	Poder de redução do íon ferro
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABAA	Receptor ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutationa redutase
GSH-PX	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa dissulfeto
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Hidroperoxila
HPV	Vírus do papiloma humano
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória em 50%
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFAV	Insumo farmacêutico vegetal
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	Organização Internacional para Padronização
IUPAC	A União Internacional de Química Pura e Aplicada IUPAC
LD	Limite de detecção



LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LOX	Lipo-oxigenase
LQ	Limite de quantificação
Mg	Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Síndrome metabólica
MSCs	Células-tronco mesenquimais
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio anidro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear kappa-Beta
NQO1	NADPH Quinona desidrogenase
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE1	Prostaglandina E1
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
RE	Resoluções Específicas
RFC	Reagente Folin-Ciocalteu
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
-SH	Sulfidrilas
SK-BR-3	Adenocarcinoma humano de seio
SOD	Superóxido dismutase
SQR	Substância química de referência
-SS	Pontes dissulfetos
TNF-α	Fator de necrose tumoralα
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	Ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
UV-VIS	Espectrofotometria de ultravioleta visível
Vitamina E	α-tocoferol
VSR	Vírus sincicial respiratório
WST	Tetrazólio solúvel em água
XO	Xantina oxidase
XTT	2,3-bis(2- metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	Revisão Bibliográfica.....	21
2.1.	<i>Thuya occidentalis</i> .....	21
2.2.	Estresse oxidativo.....	29
2.3.	Flavonóides .....	32
2.3.1.	Atividade antioxidante .....	35
2.3.2.	Atividade biológica .....	36
2.3.2.1.	Quercetina e Quercitrina .....	36
2.3.2.2.	Rutina .....	37
2.3.2.3.	Amentoflavona .....	38
2.3.2.4.	Myricitrina.....	39
2.3.2.5.	Catequina.....	40
2.4.	Monoterpeno: Tujona.....	41
2.5.	Metodologias empregadas.....	42
2.5.1.	DPPH.....	42
2.5.2.	FRAP .....	44
2.5.3.	Reagente Folin-Ciocalteu .....	45
2.5.4.	Triagem fitoquímica.....	47
2.5.5.	Determinação de flavonóides totais por cloreto de alumínio .....	48
2.5.6.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	48
2.5.7.	Atividade Antimicrobiana .....	50
2.5.8.	UPLC (Cromatografia líquida de alto desempenho ).....	51
2.5.9.	Fitoterápicos e controle de qualidade.....	53
2.5.10.	Validação de Métodos Analíticos .....	58
a)	Seletividade .....	59
b)	Linearidade.....	59
c)	Precisão .....	61
d)	Exatidão.....	63
e)	Limite de detecção .....	64
f)	Robustez.....	65

g)	Tratamento estatístico da curva de calibração.....	66
3.	OBJETIVO.....	70
3.1.	Objetivo Geral .....	70
3.2.	Objetivos específicos.....	70
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	71
4.1.	Coleta .....	71
4.1.1.	Reagentes e solventes.....	71
4.2.	Extração.....	73
4.3.	Preparação de amostras .....	73
4.4.	Preparação das formulações .....	73
4.5.	Triagem fitoquímica.....	74
2.4.1.	Teste para avaliar taninos pirogálico, fenóis, e taninos flobafênicos...	74
2.4.2.	Teste para avaliar antocianinas e antocianidina, flavonas, flavonóis, chalconas e auronas e flavononóis.....	75
2.4.3.	Teste para avaliar leucoantocianidinas, catequinas e flavonas .....	75
2.4.4.	Teste para avaliar flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas. ....	75
2.4.5.	Teste para avaliar esteroides e triterpenóides.....	76
4.6.	Fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	77
4.7.	Flavonóides Totais .....	78
4.8.	Atividade antioxidante com DPPH .....	79
4.9.	Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo método de redução do ferro - FRAP	80
4.10.	UPLC-DAD (cromatografia líquida de alto desempenho acoplado ao detector de arranjo diodo) .....	82
4.11.	Validação do método UPLC-DAD .....	83
4.12.	Citotoxicidade em linfócitos .....	87
4.13.	Atividade antimicrobiana .....	88
4.14.	Estatística .....	89
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.1.	Extratos de <i>Thuya occidentalis</i> .....	90
5.2.	Triagem Fitoquímica.....	90

5.3.	Flavonóides totais e Fenóis totais.....	92
5.4.	Atividade antioxidante por DPPH e FRAP .....	96
5.5.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	105
5.6.	Atividade antimicrobiana .....	107
5.7.	Perfil cromatográfico do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> .....	109
5.8.	Validação do método UPLC-DAD-UV .....	113
5.8.1.	Seletividade .....	113
5.8.2.	Limite de detecção e limite de quantificação e linearidade .....	113
5.8.3.	Recuperação como exatidão do método UPLC-DAD-UV .....	126
5.8.4.	Precisão intra-dia e inter-dia .....	126
5.8.5.	Robustez .....	129
5.8.6.	Aplicabilidade do método .....	131
6.	CONCLUSÃO .....	136
7.	REFERÊNCIAS .....	137
8.	APENDICE .....	148

## 1. INTRODUÇÃO

*Thuya occidentalis* pertence à família Cupressaceae, nativa da América do Norte (SURESH; GOWDA, 2016). *Thuya occidentalis* tem propriedades curativas e tem sido usada durante anos na medicina tradicional. Ela é usada como tintura em preparações homeopáticas para infecções agudas e crônicas do trato respiratório superior, verrugas, como antibiótico adjuvante e imunoestimulante (NASER *et al.*, 2005). Estudos fitoquímicos recentes foram capazes de identificar a presença de flavonóides, polissacarídeos e monoterpenos na planta, e também estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que *Thuya occidentalis* é eficaz no tratamento de várias doenças, com propriedades antibacteriana, antiviral, anticâncer, antilipêmica e atividade de hepatoproteção (OJESWI *et al.*, 2010; AKKOL *et al.*, 2015).

Devido ao potencial farmacológico dos flavonóides e a crescente necessidade de regulamentação para o processo de registro e aprovação de medicamentos fitoterápicos, é importante utilizar métodos analíticos precisos e confiáveis para controlar a qualidade das plantas, e seus compostos biológicos, durante todas as etapas de produção para assegurar a eficácia e a efetividade do tratamento com fitoterápicos (BRASIL, 2011a; PETRY; ORTEGA; SILVA, 2001; FIGUEIRÊDO *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2012);

A determinação do teor de flavonóides totais é amplamente utilizada como controle de qualidade de fármacos e seus extratos de diversas espécies vegetais. São detectados e/ou quantificados por espectroscopia, cromatografia em camada delgada, técnicas UV-vis e métodos colorimétricos com  $AlCl_3$  (BRASIL, 2011b; PRETRY; ORTEGA; SILVA, 2001; FIGUEIRÊDO *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2012). Entretanto, essas técnicas possuem

baixa seletividade, podendo ocorrer sobreposição de bandas, e fatores como tempo, tipo e concentração de flavonóides podem interferir nos resultados, o que dificulta a identificação do componente de interesse.

A Cromatografia Líquida de Alto Desempenho(UPLC) é o método mais eficiente para o controle de qualidade de fitoterápicos, e considerando a ausência de métodos analíticos validados descritos na literatura para a quantificação de flavonóides presentes em *Thuja occidentalis*. É fundamental estabelecer um método validado de identificação e quantificação dos marcadores químicos da *Thuja occidentalis*, dentro dos parâmetros de qualidade das drogas vegetais estipulados pela ANVISA para garantir a eficácia, segurança e qualidade dos fitoterápicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Thuja occidentalis*

*Thuja occidentalis* é uma planta conífera, monoíca e perene, pertencente à família *cupressaceae*, conhecida popularmente como cedro do norte, Tuiá americana, cedrinho, árvore da vida, cipreste e pinheiro do cemitério (SAMPAIO *et al.*, 2015). Sua altura varia de 15-30 metros, natural de ambientes frios. Seu tronco pode se dividir em dois ou três, gerando troncos caídos. A cor da casca pode variar de vermelha a marrom acidentada. Suas folhas são alternadas e simples por toda margem e possuem coloração esverdeada (MEENU *et al.*, 2011). Na Figura 1 é possível visualizar os ramos da planta.

**Figura 1. Ramo de *Thuja occidentalis***



**Fonte:** Autora, 2019.

Segundo Alves *et al.* (2014), a Thuya apresenta tolerância a disponibilidade de água, podendo ser encontradas em ambientes secos e alagados. Evidências sugerem que ela possui capacidade de ajustar-se osmoticamente a falta de água.

Ojeswi *et al.* (2010), Thuya foi identificada primeiro no século XVI pelos índios nativos do Canadá e mostrou-se efetiva no tratamento de escorbuto, doença provocada pela deficiência em Vitamina C, que se caracteriza pela presença de hemorragias, alterações na gengiva e queda da imunidade. Acredita-se que a planta foi usada para tratar escorbuto o explorador francês Jacques Cartier e seu grupo, no inverno de 1535-1536 (BURNS; HONKALA, 1990).

De acordo com Joseph *et al.* (2013), a Thuya é uma planta indígena da América do Norte e cultivada na Europa como planta ornamental. Normalmente é comercializada para fins decorativos, entretanto é bastante utilizada na medicina tradicional para tratar diversas enfermidades, dentre elas, reumatismo, amenorréia, cistite, psoríase, carcinomas uterinos e enxaquecas. Thuya também é usada como abortivo, contraceptivo, antidiarréico e hepatoprotor. A planta é bastante utilizada em ginecologia, pois tem mostrado efeito emenagogo (aumento o fluxo sanguíneo e provoca a menstruação) ao manter os órgãos reprodutivos femininos saudáveis, além de diminuir cólicas, náusea, fadiga associados à menstruação, ainda ajudam a manter o ciclo menstrual regulado e ao equilibrar a secreção de hormônios, como estrogênio e progesterona (AKKOL *et al.*, 2015).

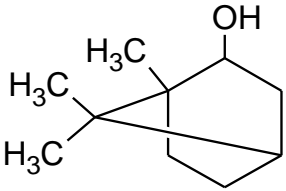
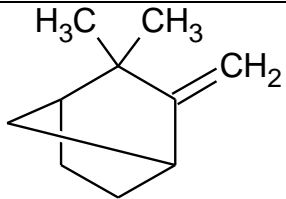
A Thuya é bastante utilizada na homeopatia como tintura mãe. Homeopatia é um método de tratamento que não segue os princípios do método alopático. Baseia-se na cura pelo semelhante, ou seja, preconiza que o paciente apenas irá obter a cura através de um medicamento que seja capaz de provocar os mesmos sintomas da enfermidade em um

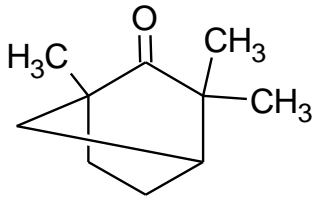
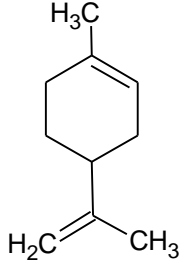
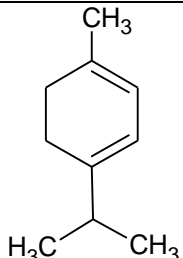
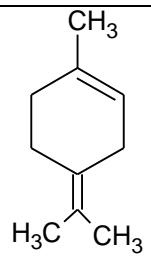
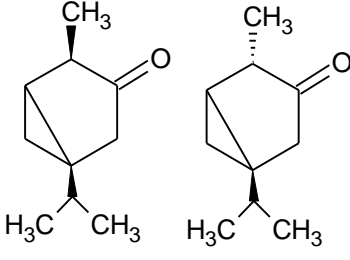
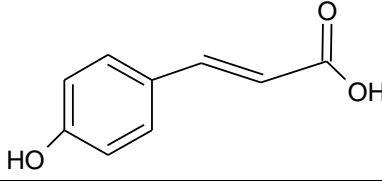
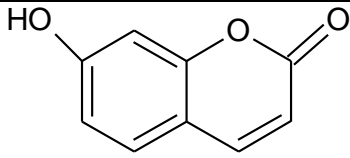


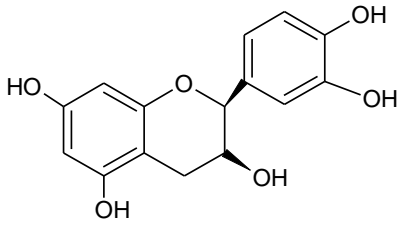
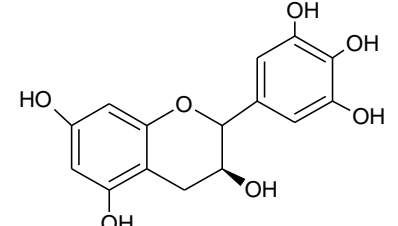
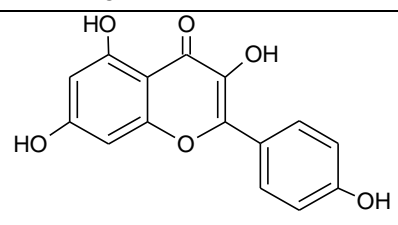
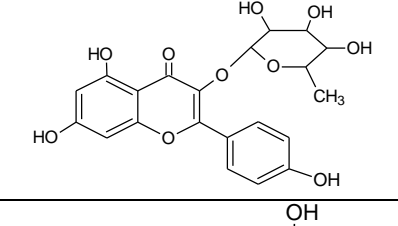
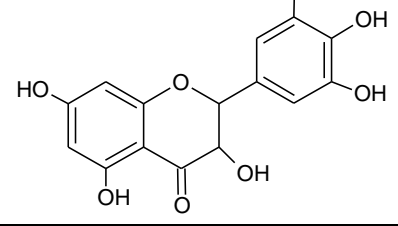
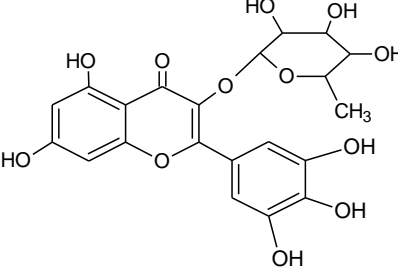
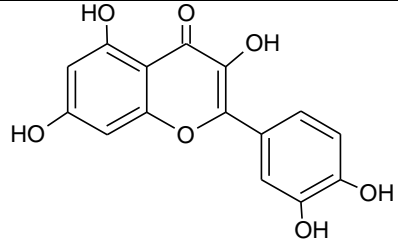
indivíduo sadio. Utiliza doses extremamente diluídas da substância e trata o paciente em todos os aspectos, físico e emocional (MACLAUGHLIN *et al.*, 2006). É usada para tratar verrugas em superfícies mucosas e cutâneas, condilomas vegetativos e tumores esponjosos (MEENU *et al.*, 2011).

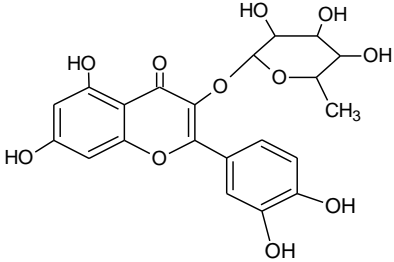
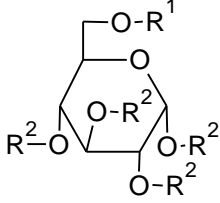
De acordo com Akkol *et al.* (2015), estudos fitoquímicos realizados com a *Thuya* indicaram a presença de terpenóides, esteroides, flavonóides, citoquinas, lignanas e polissacarídeos. E que suas propriedades medicinais estão nas folhas, ricas em óleos essenciais como: tujona, isotujona, fenchona, sabinena e  $\alpha$ -pineno. Estes metabólitos secundários podem ser extraídos da planta através de hidro destilação das folhas frescas. Estudos recentes apontam a tujona, um monoterpene, como a responsável pelas propriedades curativas da planta. *Thuya* contém em média 1,4-4% de óleo essencial (tujona perfaz 60%), 2% de gordura, 2,7% proteína, 13,9% fibra, 27,5% carboidratos e alta quantidade de cálcio. As folhas contêm também rodoxantina, amentoflavona, quercetina, myricitina, carotenóides, xantofila e ácido ascórbico (LOKESH *et al.*, 2011; AHMAD *et al.*, 2013; JASUJA *et al.*, 2015; VANACLOCHA, 2003). O Quadro 1. contém uma lista com das substâncias já identificadas na *Thuya*.

**Quadro 1. Lista dos fitoquímicos presentes no extrato de *Thuya occidentalis***

Grupo	Constituintes	Estrutura química
Óleo essencial (1.4 - 4%)	Borneol	
	Canfeno	

	Fenchona	
	Limoneno	
	Terpeno	
	Terpinoleno	
	Tujona (0.76-2.4%); $\alpha$ -tujona (85%); $\beta$ -tujona (15%)	 $\alpha$ -tujona $\beta$ -tujona
Cumarinas	Ácido p-cumarínico	
	Umbeliferona	

Flavonóides	(+/-)-catequina	
	(-)-galocatequina	
	kaempferol	
	Kaempferol-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo	
	Myricitina	
	Myricitrina	
	Quercetina	

	Quercitrina	
Outros	Ácido tanínicos	
	polissacarídeos e proteínas (4%)	

Fonte: adaptado de Naser *et al.*, 2005.

Naser *et al.*, (2005) apontam Glicoproteínas/polissacarídeos com alto peso molecular como relevantes para a atividade da planta. Dubrey e Batra (2009a) conduziram estudos para investigar as atividades biológicas da Thuya e identificaram a quercetina e Kaempferol como os principais flavonóides encontrados no vegetal. Apresentam também amentoflavona em grandes quantidades, que exibem atividade antifúngica. As ligninas e açúcares estão presentes em grandes quantidades nos extratos estão relacionados às atividades biológicas da Thuya. Normalmente as folhas jovens são utilizadas e a colheita é realizada na primavera, período no qual os agentes ativos estão em quantidades ideais. O tempo de colheita, método de secagem, intensidade e duração da luz, temperatura, altitude e estação do ano, solo, nutrição, conservação do material vegetal e método de extração, são fatores que devem ser levados em consideração, pois podem interferir na composição fotoquímica da planta e apresentar variação (ALVES *et al.*, 2014).

De acordo com Dubey e Batra (2009a), compostos fitoquímicos como fenóis, flavonóides, cumarinas, tem mostrado propriedade sequestradora de radicais livres, sendo apontado como um dos mecanismos de ação para a sua atividade antioxidante.

Estudos evidenciaram que os extratos de *Thuya* possuem diversas atividades biológicas (AKKOL *et al.*, 2015). Lokesh *et al.*, (2011) relata que *Thuya* possui atividade contra o vírus HIV-1 e influenza. Além disso, aumenta a proliferação de células do baço, a atividade de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), IL-6 (interleucina-6) e IL-1 (interleucina-1) no s erum, antidiarr eico, protege contra radiação induzida por toxidade e possui efeitos neurofarmacol gicos. Estudos com ratos mostraram um promissor efeito na melhora na memória, e efeito depressor, anticonvulsivante e atividade músculo relaxante.

Meenu *et al.* (2011) demonstrou que a atividade antioxidante nos extratos de *Thuya occidentalis* dependente da concentração do extrato, e o extrato que possui boa atividade antibacteriana e antifúngica para *Aspergillus niger*.

Segundo Dhiman *et al.* (2012) extratos de *Thuya* possuem atividade diurética, aumenta a frequência e a quantidade de urina, assim removendo água, substâncias indesejáveis e tóxicas do organismo, como sais, toxinas, ácido úrico, gorduras e micróbios. Assim ajuda a manter o corpo saudável, livre de doenças desencadeadas por acúmulo de toxinas como, reumatismo e artrite.

Possuem efeito hipolip mico, ao diminuir o colesterol, LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade). Extratos têm fibras,  $\beta$ -sitosterol e Vitamina C, que previnem a formação de coágulos nas veias e artérias, paradas cardíacas, derrame, pressão alta e colesterol alto. Um estudo realizado em ratos sugeriu que a eficácia terapêutica é refletida na contagem total do sangue, diminuição da contagem de plaquetas,

diminuição de enzimas cardíacas, e aumento direto da bilirrubina, diminuição dos níveis HDL e LDL, manutenção das proteínas totais e diminuição dos níveis de glicose sanguíneos (AHMAD *et al.*, 2013).

Ojeswi *et al.* (2010) realizou um estudo com extratos de Thuya *in vivo* no tratamento de tumores mamários, os extratos reduziram o GSH, sugerindo as propriedades oxidativas. O extrato também diminuiu o tamanho e volume do tumor estudado, devido à presença de flavonóides glicosídeos.

De acordo com Gohla *et al.* (1989) conforme citado por Joseph *et al.* (2013) extratos de Thuya podem induzir células T a se diferenciar em CD4, assim aumentando interleucina-2 (IL-2), e é capaz de reduzir lesões de papilomas provocados pelo HPV (Vírus do Papiloma Humano).

Segundo Alves *et al.* (2014), A amentoflavona exibe potente atividade antifúngica contra várias cepas patogênicas de fungo e atividade antiviral contra VSR (Vírus sincicial respiratório). Já as lignanas estão ligadas a atividades antioxidantes, antibacterianas, inseticida e nematicida e atividade alelopática. As Citoquinas (proteínas ou glicoproteínas) mostram uma melhora na reconstituição da hematopoese após altas doses de quimioterapia. A planta também possui efeito imuno-modulador.

Extratos de Thuya têm apresentado atividade antipirética com redução significativa da temperatura, após 40 h de administração, como resultado da presença de flavonóides, que atuam inibindo a ciclo-oxigenase (COX) ou lipo-oxigenase (LOX). Sendo assim inibe a síntese de prostaglandinas e atuam da mesma forma que o ácido acetil salicílico. Esse efeito se dá na PGE1 (Prostaglandina E1) (AZIZ *et al.*, 2014a).

Estudos realizados por Aziz *et al.* (2014b), revelou que o extrato de Thuya pode potenciar a propriedade sedativa do Lorazepam (benzodiazepínico) e sugere que agem na transmissão sináptica mediada por GABA (ácido gama-aminobutírico). Os constituintes fitoquímicos como flavonóides e terpenóides são conhecidos por modular a função dos receptores GABA<sub>A</sub> (receptor ácido gama-aminobutírico), assim as propriedades sedativas podem estar relacionadas à presença destes.

Vanaclocha (2003) alerta para os cuidados com uso da Thuya, devido ao efeito neurotóxico da tujona, que pode causar em doses elevadas crises epiléptiformes e tetaniformes, transtornos psíquicos, e sensoriais e hipotensão.

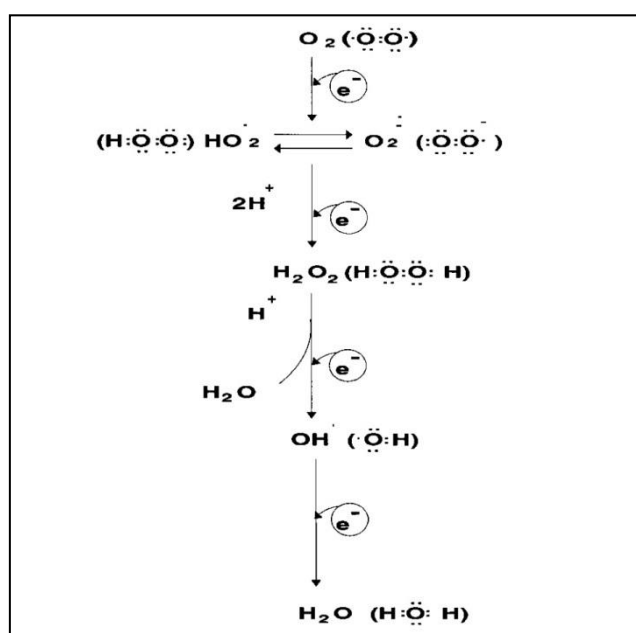
## **2.2. Estresse oxidativo**

Segundo Ferreira e Matsubara (1997) radical livre é um termo usado para referir-se a um átomo ou molécula altamente reativa com elétrons desemparelhados em sua camada de valência, formados através reações de oxido-redução. Sendo então denominados espécies reativas do oxigênio (EROs).

EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos, onde há metabolismo aeróbio. O O<sub>2</sub> sofre redução tetravalente, formando água (H<sub>2</sub>O). A reatividade de EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons, que ocorre em nível mitocondrial. Neste processo são formados intermediários reativos: radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que participa da reação de Fenton e produz OH•. Na Figura 2 é possível visualizar o processo de redução do oxigênio até a formação de água, e a produção de seus intermediários. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é produzido através de neutrófilos, monócitos e

macrófagos e eosinófilos ativados e é responsável por lesões biológicas secundárias decorrentes do metabolismo do oxigênio. O radical  $\text{OH}^\bullet$  pode se combinar com metais (através de reações de Fenton ou Harber-Weis) e outros radicais, modificando as bases do DNA (ácido desoxirribonucleico), o que leva a inativação ou mutação do DNA. O  $\text{OH}$  pode inativar proteínas, oxidando grupos sulfidrilas ( $-\text{SH}$ ) e pontes dissulfeto ( $-\text{SS}$ ) e oxidar ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares promovendo a lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

**Figura 2. Redução do oxigênio até a formação de água, com seus respectivos EROs intermediários formados no processo**



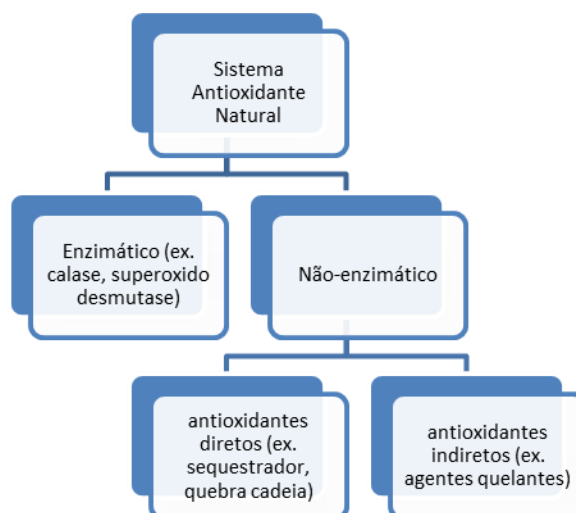
Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

Organismos aeróbios produzem substâncias desoxidantes, que neutralizam agentes oxido-redutores, como EROs, com o objetivo de manter o equilíbrio fisiológico. Dividem-se em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos, que vão agir como agentes antioxidantes. Os não-enzimáticos são compostos adquiridos através da dieta. Entre os enzimáticos estão:



Glutationa redutase (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutaciona peroxidase (GSH-PX) e Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), esses são produzidos endogenamente. Todos estes agentes estão localizados no meio intracelular, com exceção da Vitamina E, que está localizada na membrana. Esses agentes podem atuar de duas maneiras, neutralizando o EROs antes de provocar lesão e reparando a lesão sofrida. A Vitamina E protege a membrana ao atuar como um agente quelante. A capacidade redutora do GSH está no grupamento –SH (presente na cisteína), protege de lesões ocasionadas por íons de ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação, luz ultravioleta, agentes químicos e elimina produtos de lipoperoxidação. Os outros agentes desoxidantes atuam catalisando EROs (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; UTTARA *et al.*, 2009). A figura 3 informa os tipos de agentes antioxidantes naturais.

**Figura 3. Categorias de antioxidantes naturais**



**Fonte:** adaptado de UTTARA *et al.*, 2009

Estresse oxidativo é responsável pelo desenvolvimento de doenças. Acontece quando há um desequilíbrio no sistema, com deficiência de GSH e produção de GSSG (glutationa dissulfeto). Glutationa dissulfeto é o produto da redução de peróxidos pelas glutacionas

peroxidases e redutases. Ou seja, estresse oxidativo ocorre quando os agentes desoxidantes não são suficientes para neutralizar os EROs, gerando efeito deletérios na membranas celulares e outras estruturas como proteínas, lipídeos e DNA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C., 2008).

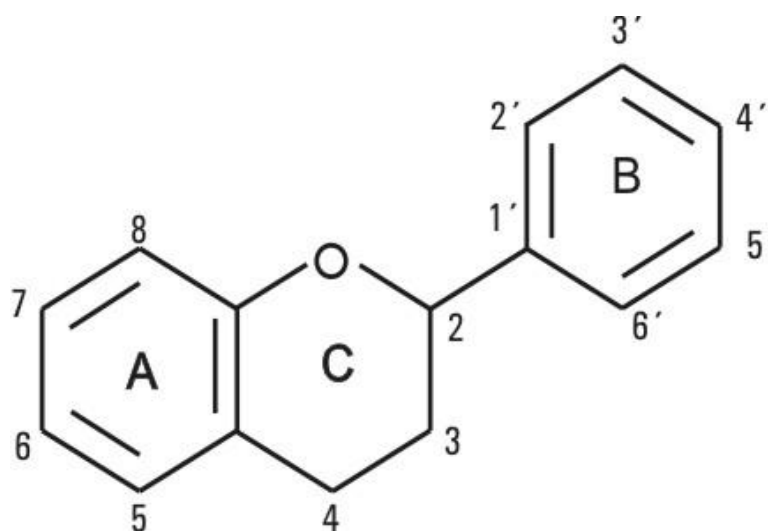
EROs causam ou são responsáveis por desencadear doenças e eventos fisiológicos. Entre elas, envelhecimento, Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e catarata, estão relacionados com o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os eventos desencadeados por espécies reativas de oxigênio são:

- Envelhecimento;
- Mutações;
- Aterosclerose;
- Lesão por toxicidade de O<sub>2</sub> em pulmão e retina;
- Lesão pós-isquemia e reperfusão de cérebro, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, musculo, rins e pulmões;
- Lesões pós-concussão cerebral e pós-hipertensão intracraniana;
- Síndrome demencial;
- Disfunção renal pós-transplante;
- Artrite reumatoide;
- Hemocromatose transfusional;
- Doenças autoimunes;
- Toxicidade decorrente da exposição a xenobióticos.

### **2.3.Flavonóides**

Flavonóides são metabólitos secundários produzidos pelos vegetais. São compostos polifenólicos biosintetizados a partir da via do ácido chiquímico e do acetato, e são precursores de vários grupos de substâncias, como: aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos, etc. Possuem 15 carbonos em sua estrutura química, organizados em dois anéis aromáticos A e B ligados a um anel pirano C formado por uma cadeia de três carbonos (difênil C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> propano). Na figura 4 é possível visualizar a estrutura básica do flavonóide.

**Figura 4. Estrutura básica dos Flavonóides**

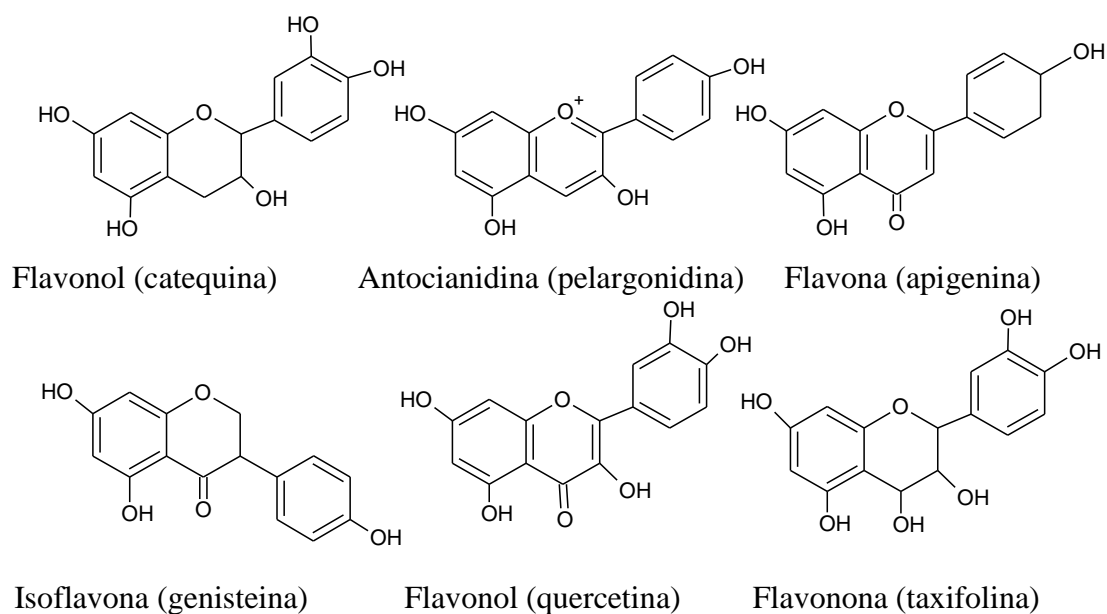


**Fonte:** Autora, 2019.

São mais de oito mil flavonóides identificados, e estão subdivididos de acordo com suas características químicas e biosintética. Essa variedade estrutural se dá por meio de reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. “Dividem-se em: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavonas, flavanas, antocianidinas, leucocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides” (DORNAS *et al.*, 2007). Podem ser encontrados, oxigenados e conjugados ao açúcar ou na forma de agliconas (forma livre sem açúcar), glicosídeos, derivados metilados ou acetilados. É possível visualizar a estrutura química dos subgrupos de

flavonóides na Figura 5, dentre eles: quercetina, myricetina, Kaempferol, que são os flavonóis mais encontrados nos vegetais (BEHLING *et al.*, 2004; FERREIRA; OLIVEIRA; SOUZA, 2008; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

**Figura 5. Estrutura química dos principais Flavonóides**



**Fonte:** Autora, 2019.

Frutas e hortaliças são as principais fontes dietéticas de flavonóides, estima-se um consumo diário entre 26 mg a 2 g na dieta humana. Não é possível calcular a quantidade exata presente nos alimentos, pois os alimentos comercializados não informam a quantidade de flavonóides presentes. Apesar dos flavonóides serem importantes na dieta, não possuem valor nutritivo. Flavonóides concentram-se nas folhas, sementes, raízes, frutos, flores e cascas dos vegetais. Quercetina é o principal flavonóide presente na dieta humana, com ingestão diária estimada entre 50 a 500 mg. Plantas e condimentos contendo flavonóides são usados há anos

na medicina tradicional (BEHLING *et al.*, 2004; DORNAS *et al.*, 2007; FERREIRA; OLIVEIRA; SOUZA, 2008).

Flavonóides possuem papel importante no crescimento e desenvolvimento do vegetal, no processo de fotossíntese, na respiração, no transporte de solutos, na translocação, na síntese de proteínas, na assimilação de nutrientes, na diferenciação ou síntese de carboidratos e lipídios. Flavonas e flavonóis atuam como protetores químicos absorvendo a luz e evitando danos causados pelo fotoxidação e atuam como atrativos de insetos. Flavonóides têm evidenciado uma ação antioxidante na proteção e no tratamento de doenças degenerativas mediada por estresse oxidativo. São usados como marcadores taxonômicos (DORNAS *et al.*, 2007; FERREIRA; OLIVEIRA; SOUZA, 2008).

### **2.3.1. Atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura. Estudos indicam que uma hidroxila em C3 e C4 no anel heterocíclico e ou um Catecol no anel B favoreçam a atividade antioxidante dos flavonóides. As hidroxilas podem doar elétrons e suportar a deslocalização em torno do sistema aromático. Sendo assim capazes de neutralizar EROs (DORNAS *et al.*, 2007; FERREIRA; OLIVEIRA; SOUZA, 2008).

Behling *et al.* (2004), propõe cinco mecanismos responsáveis pela atividade antioxidantes dos flavonóides: inibição do sistema enzimático gerador de radicais livres; quelação de íons metálicos; sequestro de radicais livres; proteção das defesas antioxidantes, pela indução da fase 2 de enzimas (como glutathione transferase), que aumenta a excreção de

EROS; indução de enzimas antioxidantes, como metalotioneína (proteína queladora de metais).

### **2.3.2. Atividade biológica**

Segundo Sampaio *et al.* (2015), estudos epidemiológicos sugerem que o flavonóides devido a suas atividades antioxidantes, possuem efeito positivos sobre a prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e insuficiência renal e hepática.

Como estresse oxidativo e inflamação são fatores de risco cardiovascular, propriedades oxidativas e anti-inflamatórias dos compostos podem servir com protetores (JASUJA *et al.*, 2015). Sendo assim, ao associar uma dieta rica em alimentos derivados de plantas, contendo flavonóides, a prática de atividade física, os flavonóides possuem papel importante na diminuição do risco de desenvolver doenças crônicas.

#### **2.3.2.1. Quercetina e Quercitrina**

A quercetina é o flavonóide mais comum na natureza e está presente na forma glicosilada de quercitrina. Quercetina exibe atividade antioxidante devido à capacidade de sequestrar radicais livres e de quelar íons metálicos, sendo capaz de estabilizar o ferro. Inibe a formação de EROs em três etapas diferentes: na inicialização, na formação de radicais hidroxilas e na lipoperoxidação. E ainda inibe a xantina oxidase. Conseqüentemente protege os tecidos do estresse oxidativo (BEHLING *et al.*, 2004). Possui várias propriedades

terapêuticas e ultimamente vem sido muito estudada, devido ao seu potencial antioxidante, anticarcinogênico e hepatoprotetor, cardioprotetor e nefroprotetor (SAMPAIO *et al.*, 2015).

Estudo envolvendo quercitrina mostrou que a quercitrina libera a quercetina para realizar seu efeito anti-inflamatório que é mediado pela inibição da via do NF- $\kappa$ B (COMALADA *et al.*, 2005). Outro estudo mostrou que a quercitrina melhora a atividade antioxidante no tecido de ratos com diabetes e também melhora a produção de insulina no pâncreas (BABUJANARTHANAM *et al.*, 2011), e um estudo envolvendo quercitrina e isoquercitrina mostrou que ambos os flavonóides têm propriedades citoprotetoras e podem participar direta e indiretamente da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para proteger as MSCs (células-tronco mesenquimais) contra o dano oxidativo induzido por ROS (LI *et al.*, 2016).

#### **2.3.2.2. Rutina**

A rutina é um flavonóide glicosídico e é prescrita para o tratamento de várias doenças, como veias varicosas, hemorragias internas ou hemorroidas, e estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a rutina pode ser utilizada como agente antimicrobiano, antifúngico e antialérgico, e também mostrou seus benefícios farmacológicos para o tratamento de várias doenças crônicas, como câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (GULLÓN *et al.*, 2017). As atividades biológicas da rutina, principalmente atribuídas à potente propriedade antioxidante da rutina, particularmente como um removedor de radicais livres (CHUA, 2013; YANG *et al.*, 2008)) A rutina mostrou aumentar a ação antibacteriana dos flavonóides, como quercetina, morina, galangina, Kaempferol, myricitina e fisetina (ARIMA; ASHIDA;

DANNO, 2002). Outro estudo envolvendo a rutina mostrou que pode retardar o início e a progressão da doença de Parkinson, protegendo as alterações induzidas pela 6-OHDA (6-hidroxidopamina, neurotoxina usada para induzir o mal de Parkinson) nos parâmetros comportamentais, bioquímicos e histopatológicos em ratos (KHAN *et al.*, 2012).

### **2.3.2.3. Amentoflavona**

Amentoflavona é uma classe de flavonóides, exibindo várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatório, antioxidante, anti-psoriático e antitumoral; e tem sido usado para o tratamento do câncer avançado na medicina tradicional oriental e, como agente antioxidante, vaso relaxante, anti-HIV e antiangiogênese, também previne a lesão pulmonar aguda associada à sepse por meio da regulação positiva da glutathione e lesões cutâneas tipo psoríase através da supressão da inflamação mediada por NFκB (Fator nuclear kappa-Beta) e proliferação de células queratinosas (LEE *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2018). Estudos recentes mostraram que a amentoflavona exerce atividade inibidora de FASN (Ácido graxo sintase), induz apoptose dependente de caspase e diminuí a proliferação de células de câncer de mama SK-BR-3 (Adenocarcinoma humano de seio) super-expressas com FASN (LEE *et al.*, 2009), mas também aumenta o nível de ativação de receptores estimulada por insulina possivelmente devido ao seu efeito inibitório sobre a PTP1B (Proteína tirosina fosfatase 1B) (NA *et al.*, 2007). Outro estudo sugere que amentoflavona usada como combinação pode ser uma potente abordagem anticâncer para o tratamento de câncer de pulmão humano, especialmente aqueles com super-expressão de AKR1B10 (Família Aldo-Keto Redutase 1 Membro B10), uma vez que amentoflavona inibe AKR1B10 (JUNG *et al.*, 2017). Outro estudo mostrou que amentoflavona pode proteger contra o fígado gordo através de suas atividades antioxidantes



via regulação das atividades da NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidase e que amentoflavona exibe efeitos protetores contra disfunção cardiovascular e lesão hepática em ratos MS(Síndrome metabólica) (QIN *et al.*, 2018).

#### **2.3.2.4. Myricitrina**

Estudos com myricitrina mostraram efeitos ansiolíticos, antinociceptivos, anti-inflamatórios e antioxidantes e que a administração de myricitrina em miotubos (percussores de fibras musculares após diferenciação dos mioblastos) de ratos tem efeitos antioxidantes, e melhora a hiperglicemia devido ao aumento da captação de glicose, conteúdo de glicogênio concomitante com diminuição da apoptose celular e aumento da viabilidade dos miotubos (AHANGARPOUR *et al.*, 2018). Zhang *et al.*(2016) mostraram que a myricitrina aumentou a expressão de genes, ativou a fosforilação e promoveu a sinalização de Nrf2. Zhang *et al.*(2017) também mostraram que o tratamento com myricitrina pode proteger significativamente o coração das alterações estruturais e funcionais associadas à inflamação cardíaca, estresse oxidativo e apoptose em camundongos diabéticos. Outro estudo mostrou que a myricitrina tem propriedades protetoras de DNA, sua proteção contra danos e células do estresse oxidativo (KASSEM *et al.*, 2016). Outro estudo indicou que a myricitrina tem propriedades anti-osteoporose, protege células do estresse oxidativo e disfunção induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* a 0,1-10 µM, o tratamento com myricitrina é acompanhado por uma diminuição no estresse oxidativo e citocinas de reabsorção óssea (HUANG *et al.*, 2014). Outro estudo mostrou que a myricitrina tem efeito hepatoprotetor, melhora a lesão hepática tóxica por vários mecanismos, atuando como guardiões do sistema de defesa antioxidante,

inibidores da inflamação e supressores da resposta pro fibrótica, bem como potenciadores da regeneração hepática (DOMITROVIĆ *et al.*, 2015).

#### **2.3.2.5. Catequina**

A catequina é um dos polifenóis mais abundantes e mais estudados do chá verde e do vinho. Tem demonstrado efeitos biológicos e farmacológicos como: propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas, anticancerígenas e antimicrobianas (LU *et al.*, 2013).

Chung *et al.* (2004) estudou a atividade de poli-catequinas e observou que estas atuam como agentes antioxidantes mais potentes e inibidores enzimáticos do que a catequina monomérica, ao demonstrar grande amplificação das atividades para eliminar os radicais superóxido, inibir o XO e a peroxidação de LDL e proteger as células endoteliais da lesão oxidativa, devido ao seu maior peso molecular e a proximidade dos anéis aromáticos. You, Lou e Wu (2014) conjugou a catequina a ovoferrina e observou o aumento da atividade antioxidante da proteína.

Um estudo realizado por Lu *et al.* (2013) eles incorporaram a molécula da catequina a molécula de insulina, através de um método desenvolvido por eles e avaliaram a atividade antidiabética *in vitro* por meio de ensaio de inibição da  $\alpha$ -glicosidase  $\alpha$ -amilase. Essas enzimas retardam a digestão de carboidratos e prolongam o tempo total de digestão de carboidratos, causando uma redução na taxa de absorção de glicose e conseqüentemente diminuindo o aumento de glicose plasmática pós-prandial. E eles observaram que o complexo catequina-insulina teve ação antidiabética superior a acarbose, que é um fármaco para o

tratamento de diabetes mellitus tipo 2, que foi atribuído ao sinergismo entre as duas estruturas dos compostos. Zhao *et al.*(2016) estudou a atividade antidiabética da catequina associada a cafeína em ratos, e observou um sinergismo na ativação de AMPK, enzima responsável pela estimulação do metabolismo lipídico ao fosforilar as enzimas alvos nos adipócitos e consequentemente pode liberar leptina e aumentar insulina. E Huang *et al.* (2011) também observou que aumente a secreção de insulina de forma significativa e dose-dependente. O estudo mostrou um efeito hipoglicêmico em camundongos devido à sua ação como secretagoga de insulina.

Outro estudo mostrou que a catequina possui atividade antibacteriana ao inibir o crescimento de maneira dose-dependente a bactéria *E. coli* (CHUNMEI *et al.*, 2010).

Um estudo realizado em ratos observou que a catequina inibe a enzima NQO1, que é geralmente super-expressa em certos tipos de câncer e usada como alvo em diversa terapias (WIEGAND *et al.*, 2009).

#### **2.4.Monoterpeno: Tujona**

Monoterpenos são óleos essenciais e metabólitos secundários dos vegetais, que possuem a seguinte estrutura química ( $C_{10}H_{16}$ ) formada por duas unidades isopreno. A tujona é um monoterpeno, encontrado em grandes quantidades nas espécies de *Thuya occidentalis*, na forma de seus isômeros  $\alpha$ -tujona e  $\beta$ -tujona. No Quadro 1 é possível visualizar a estrutura química da tujona. De acordo com a agência Européia para avaliação de produtos medicinais (EMA), as folhas secas contêm 7,6 mg/g de tujona, sendo 85% de  $\alpha$ -tujona, e 15%  $\beta$ -tujona. Tujona é uma neurotoxina psicoativa e possui atividades farmacológicas e tóxicas quando

administrada em doses elevadas. Estudos recentes apontam a tujona como responsável pelas propriedades curativas da planta. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado atividade anticancerígena, se mostrou efetivo no tratamento de câncer mamário e melanoma maligno, e em outros tipos de cânceres, quando administrado em doses superiores a 1 mg/kg de massa corporal, possui a atividade antiproliferativa e propriedade indutora de apoptose. É também potencialmente efetiva no tratamento da síndrome do ovário policístico, regulando hormônios, possui propriedade antibacteriana, antiviral, imunoestimulatória e é capaz de tratar em 84% dos casos verrugas decorrentes de HPV. Pesquisas mostraram que a tujona é um bloqueador do GABA<sub>A</sub>. Tujona vêm sido utilizada na fabricação de descongestionantes nasais, supressores de tosse, perfumes, polidores de sapatos e sabão (NASER *et al.*, 2005; MEENU *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2014; JASUJA *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2016).

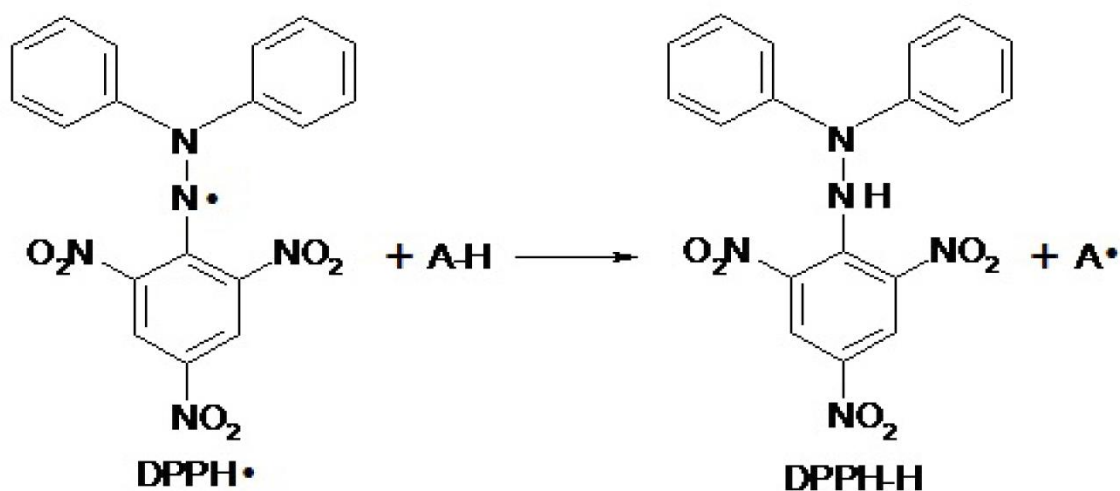
## **2.5. Metodologias empregadas**

### **2.5.1. DPPH**

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável, possui elétron ímpar em sua camada de valência, que pode aceitar um elétron ou radical hidroxila para se tornar uma molécula diamagnética. Devido a sua capacidade sequestradora de radicais livres. É um método quantitativo, fácil e útil, por isso é bastante utilizado para testar a capacidades de composto de atuarem como agentes antioxidantes, captando EROs, sejam eles substâncias puras ou amostras complexas. DPPH possui coloração púrpura, que absorve no comprimento de onda 518 nm, a ação de uma agente oxidante reduz o DPPH para DPPH-H (2,2-difenil-1-

picril-hidrazina), de coloração amarela, desaparecendo da banda de absorção. A Reação pode ser vista na Figura 6. A atividade antioxidante do composto é monitorada pela diminuição da absorbância através de espectrofotometria de Ultravioleta visível (UV-VIS), uma vez que os elétrons do DPPH se tornam emparelhados ao reagir com um agente redutor adequado, como resultado a cor da solução muda e há a diminuição da absorbância das soluções com diferentes concentrações da amostra. A percentagem da atividade antioxidante é calculada com bases nos resultados de absorbância, ou seja, a quantidade de DPPH consumida pelo agente antioxidante ou sequestrador de radicais. O método sofre influência de solvente (pode-se utilizar metanol ou etanol) e do pH (DUBEY; BATRA, 2009a; OLIVEIRA *et al*, 2009; JASUJA *et al* 2015; MENDONÇA *et al*, 2015).

**Figura 6. Reação de redução do DPPH a DPPH-H**



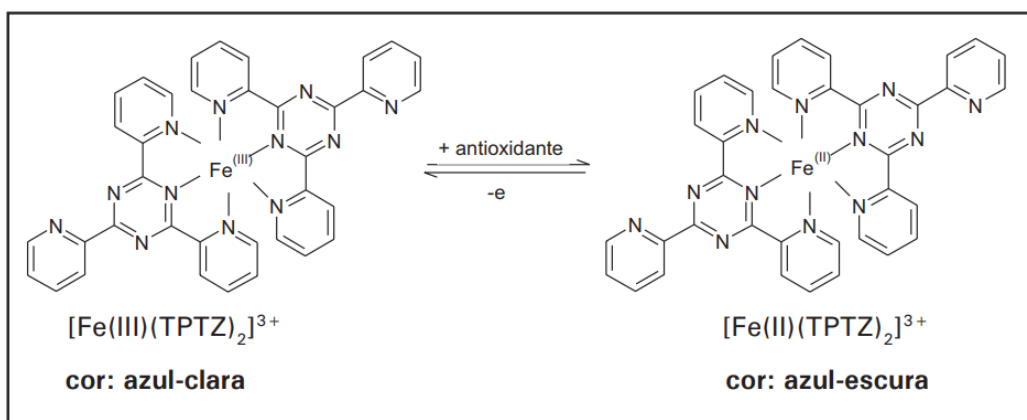
Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009.

### 2.5.2. FRAP

O ensaio antioxidante de poder de redução do íon ferro (FRAP) é um método colorimétrico simples e confiável para medir a capacidade antioxidante total de vários compostos (BENZIE; STRAIN, 1996). O método foi inicialmente proposto para medir a capacidade antioxidante total do plasma e atualmente é aplicado a outros substratos. O método têm sido frequentemente utilizado para uma avaliação rápida da capacidade antioxidante total de vários alimentos e bebidas e também diferentes extratos vegetais contendo flavonóides. O ensaio FRAP baseia-se na medição da capacidade da substância para reduzir  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$ .  $Fe^{2+}$  é medido espectrofotometricamente através da determinação do seu complexo colorido com 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), passando de uma cor azul claro para um azul escuro, cuja absorbância é medida no aparelho de espectrofotometria de Ultravioleta visível (UV-VIS) no comprimento de onda 595 nm. Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante e uma vez que ensaio de FRAP mede diretamente a capacidade de redução da substância, que é considerado um parâmetro importante na determinação de um bom antioxidante (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016; FIRUZI *et al.*, 2005).

Na Figura 7 é possível visualizar a reação de redução de ferro ao reagir com TPTZ. O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

**Figura 7. Redução do complexo TPTZ com  $\text{Fe}^{3+}$**



Fonte: [http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct\\_125.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct_125.pdf)

### 2.5.3. Reagente Folin-Ciocalteu

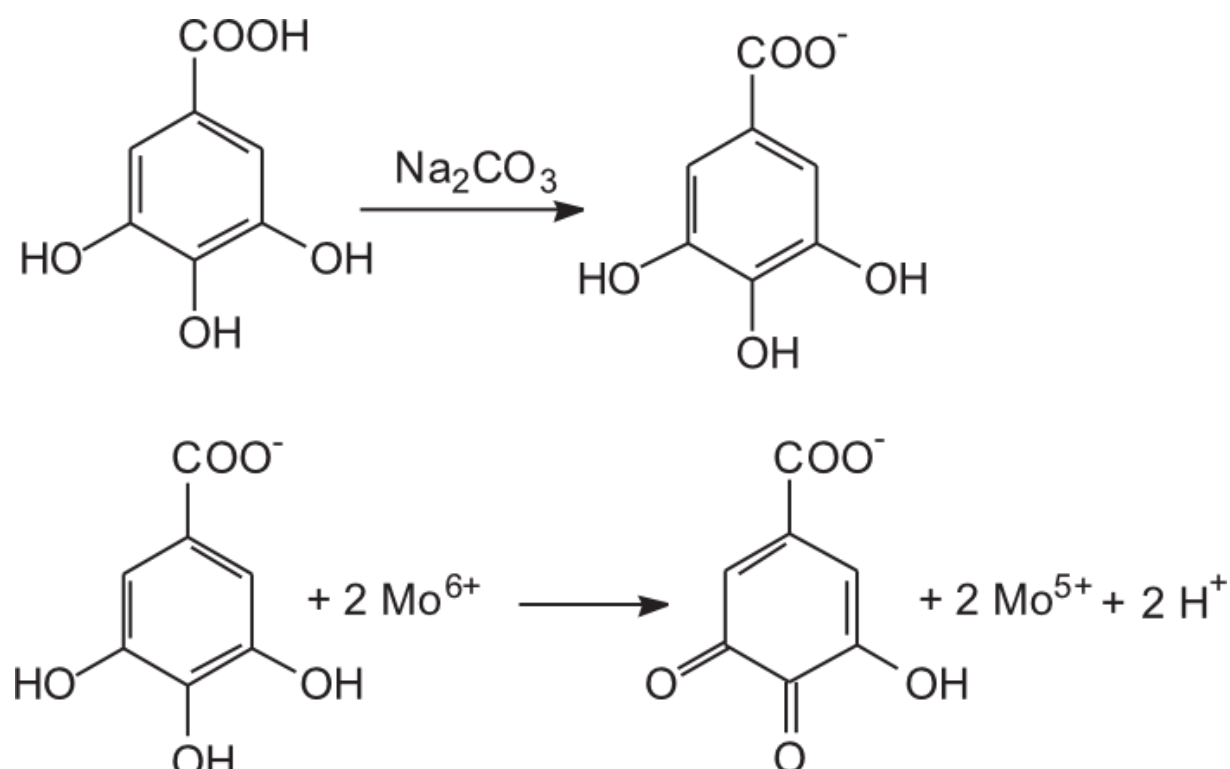
O reagente Folin-Ciocalteu seguido da exposição de vapores de amônia é o reagente de escolha para a detecção de flavonóides. Onde o núcleo catecol ou hidroquinona fica azulado, e podem assim ser identificados. Este método é bastante utilizado para determinação e quantificação de fenóis totais. Fenóis são importantes devido a sua capacidade de sequestrar radicais livres, devido a seus grupos hidroxilas (DUBEY; BATRA, 2009b).

O método do Reagente Folin-Ciocalteu (RFC) baseia-se na mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico, na qual o molibdênio (componente do RFC) se encontra no estado de oxidação (possuindo cor amarela), mas na presença de agentes redutores, como compostos fenólicos, forma o complexo molibdênio-tungstênio azuis. Normalmente usa-se ácido gálico como padrão nessa reação, sendo necessário elaborar uma curva de calibração do ácido gálico dissolvido em um solvente (metanol). Na Figura 8 é possível visualizar essa

reação. Sendo assim, mostra a desprotonação do ácido gálico (um composto fenólico), em meio alcalino, resultando em ânions fenolatos, logo em seguida sofre uma reação de oxirredução com o reagente de Folin, onde o molibdênio é reduzido e a coloração muda de amarela para azul. É um teste que é usado para medir a capacidade redutora da amostra, deve-se tomar cuidado com interferentes durante a análise, que podem provocar o aumento de absorbância, então se recomenda determinar os possíveis interferentes, entre os interferentes estão a Vitamina C. Utiliza-se uma mistura do RFC, amostra, água destilada e carbonato de sódio ou cálcio, em concentrações diluídas e variadas, onde a mistura sofre agitação e em seguida permanece por 2h em temperatura ambiente, no escuro. Em seguida é realizada uma leitura no UV-VIS, onde o comprimento de onda é observado na faixa de 760 nm, conseqüentemente o valor da absorbância da solução é informado (DUBEY; BATRA, 2009a; OLIVEIRA *et al.*, 2009; HOSSAIN *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2015).



Figura 8. Reação do ácido gálico com o RFC



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009.

#### 2.5.4. Triagem fitoquímica

É um método de identificação colorimétrico, bastante utilizado para identificar compostos fitoquímicos presentes em espécies vegetais, pela sua facilidade e rapidez. Se baseiam na reação química entre os compostos esperados nos extratos vegetais e reagentes detectores conhecidos e são comumente utilizados em testes preliminares de prospecção fitoquímica. Um dos métodos mais utilizados é o proposto por Matos (1997). A amostra vegetal é diluída em um solvente apropriado e uma alíquota é transferida para tubos de ensaio. O composto irá reagir com o reagente e a coloração da solução irá mudar permitindo assim a

identificação dos fitoquímicos. São ensaios padronizados e pelo menos cinco testes de identificação colorimétrica podem ser reproduzidos.

#### **2.5.5. Determinação de flavonóides totais por cloreto de alumínio**

Cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) é um método muito utilizado na identificação e doseamento de flavonóides. Vennat *et al.* (1992) propôs o método espectrofotométrico, utilizando-se  $\text{AlCl}_3$  e a quercetina como padrão, sendo necessário construir uma curva de calibração com quercetina, para calcular e validar os valores de absorbância dos flavonóides, além de realizar um ensaio em branco.

O método funciona da seguinte maneira: “O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção” (MARCUCCI *et al.*, 2016).

A leitura é realizada na faixa de 425 nm no UV, utilizando  $\text{AlCl}_3$  a 5% em metanol. O complexo flavonóide-Al absorve luz em comprimento maior que outras substâncias como ácidos fenólicos, por isso não há interferência e o flavonóide pode ser identificado. O método é preciso e reproduzível, com pouco desvio (MARCUCCI *et al.*, 2016).

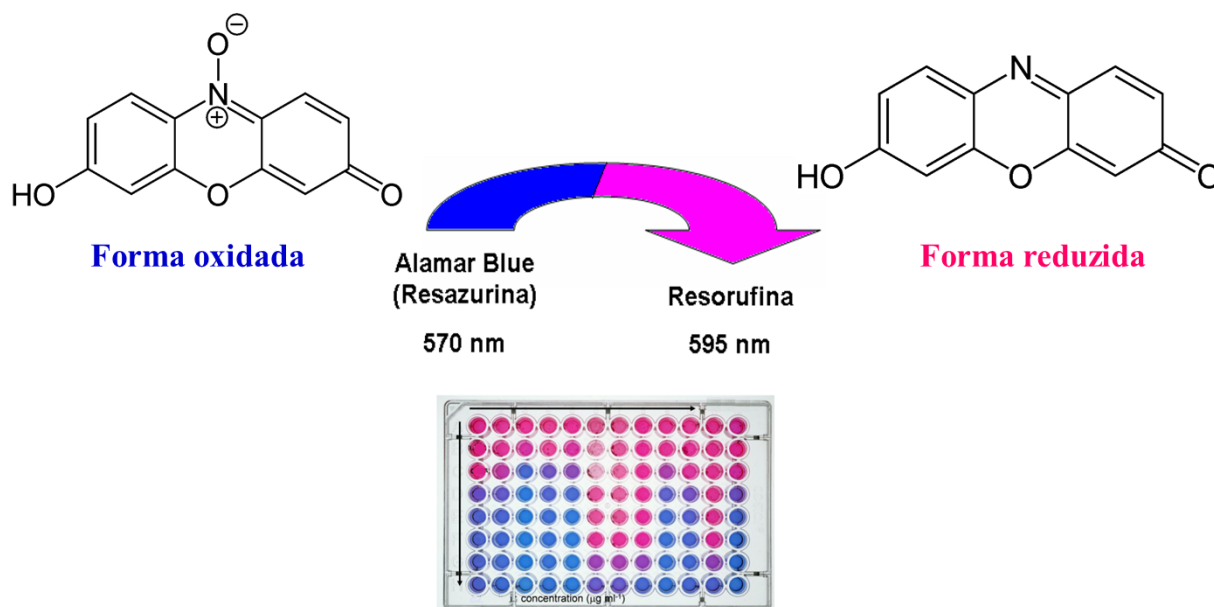
#### **2.5.6. Citotoxicidade *in vitro***

Os linfócitos T são células responsáveis pela imunidade dos mamíferos e quando são apresentados por moléculas MHC são ativados e iniciam assim sua diferenciação celular, gerando células que exercem função imunológica (CD8+ e CD4+). Ensaios de proliferação *in vitro* são amplamente utilizados para a finalidade de avaliar a função dos linfócitos e sua resposta a estímulos. A potência de várias drogas imunomoduladoras *in vitro* pode ser avaliada simplesmente medindo-se as taxas de proliferação celular na presença destes compostos (GIBSON *et al.*, 2016).

Para a avaliação da viabilidade celular existe uma variedade de métodos aplicados e descritos na literatura como: os métodos baseados em reações bioquímicas: MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio], XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida], WST (tetrazólio solúvel em água) que são marcadores para atividade enzimática das mitocôndrias; e LDH (lactato desidrogenase) que é um marcador de lise celular (FRANCHI; TAKAHASHI, 2012). Já ensaios colorimétricos, se baseiam na medição da liberação do corante liberado da célula alvo ou da medição do número de células viáveis. A avaliação da citotoxicidade de linfócitos usando corante intravital com alamar blue (resazurina) é muito usada, pois não é radioativa e é mais sensível a pigmentação, que os outros testes citados acima (KHROMYKH; ANFALOVA; KAZANSKII, 2003).

Alamar blue ou resazurina (azul e não fluorescente) é reduzido do por células viáveis à resorufina (róseo e altamente fluorescente), mensurando indiretamente a viabilidade celular, pode indicar proliferação ou morte celular. Pode ser visualizado na figura 9. As placas são incubadas por 37°C por 1–4 h para que as células viáveis façam a conversão do reagente colorimétrico. A conversão de resazurina é proporcional ao número de metabólicos ativos, células viáveis presentes na população (BOMFIM, 2014). A intensidade da cor rosa reflete a extensão da viabilidade celular (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

**Figura 9. Reação de oxidação da Resazurina**



Fonte: BOMFIM , 2014.

### 2.5.7. Atividade Antimicrobiana

A busca por novos antibióticos, devido a grande ameaça de resistência de cepas de bactérias, é de grande importância o estudo e pesquisas de novas moléculas e novos fármacos com ação antibacteriana (IDSA, 2010 apud ALMEIDA, 2013). Sendo assim, plantas medicinais são uma fonte promissora de princípios ativos, devido a complexidade de sua composição, que podem atuar diretamente ou modulando a resistência dos antibióticos aumentando a eficácia dos fármacos sobre a resistência bacteriana (CHOWDHURY *et al.*, 2014; SAMOILOVA, *et al.*, 2014; apud ALMEIDA, 2013).

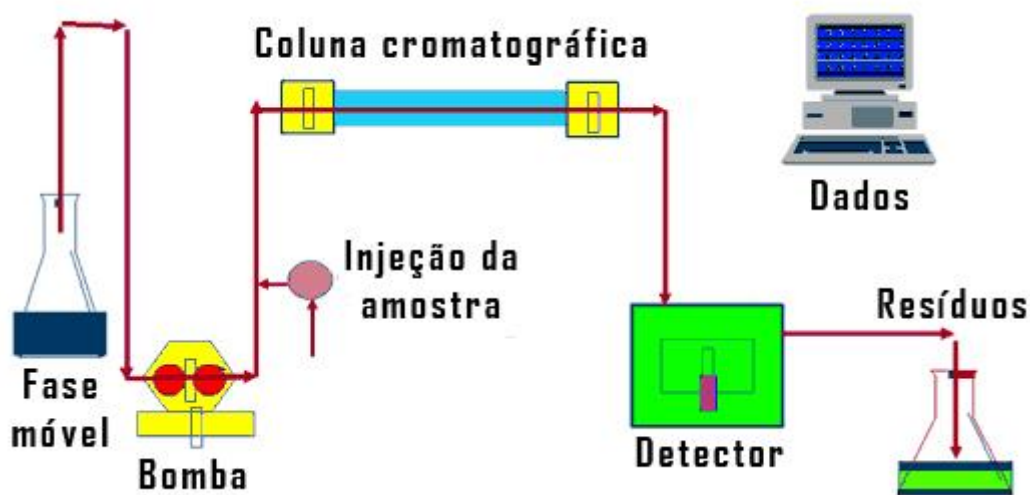
Uma maneira de analisar a atividade bacteriana é por meio de ensaios microbiológicos, entre eles a da microdiluição, que avalia qualitativamente/quantitativamente a potência e/ou

atividade de princípios ativos. Nele, os padrões antibacterianos são postos em meio de cultura líquido, sob várias concentrações diferentes e, a extensão da inibição do crescimento do micro-organismo é quantificada através de indicadores de reação. Os resultados são dispostos em CIM (Concentração Bactericida Mínima), que é a menor concentração que apresenta atividade capaz de inibir o crescimento de microorganismo testado. (AULTON, 2005 apud ALMEIDA, 2013). É um método barato e altamente reprodutível, sensível e requer uma quantidade menor de amostra (OSTROSKY *et al.*, 2008).

#### **2.5.8. UPLC (Cromatografia líquida de alto desempenho)**

A identificação e quantificação das substâncias presentes na amostra são realizadas através do aparelho UPLC (Cromatografia líquida de alto desempenho) que vai purificar e isolar os constituintes da amostra por meio de solventes com polaridades diferentes da sílica utilizada na coluna cromatográfica. Este aparelho pode estar acoplado ou não a um aparelho detector como UV (Ultravioleta visível) ou DAD (detector de arranjo de diodo). O Ultravioleta visível (UV) permite identificar os compostos na amostra através da emissão da luz. Cada analito irá absorver a luz em comprimentos de onda diferentes, sendo possível identificá-los. O UV é capaz de variar o comprimento de onda de detecção, mas apenas uma leitura é feita a cada tempo, já o detector DAD é capaz de detectar vários comprimentos de onda simultaneamente. É uma técnica que possui alta exatidão e precisão, com ótima capacidade de detecção. É sensível, uma vez que é capaz de detectar compostos em pequenas concentrações e pode ser usado em matrizes complexas. O UPLC é mais efetivo que a cromatografia líquida clássica, devido a emprego de colunas menores, onde as partículas são compactadas, como resultado há um aumento da resistência do fluxo da fase móvel, sendo necessário o uso de bombas para manter o fluxo e a pressão constante durante a análise. É uma técnica versátil, pois contém várias fases estacionárias que podem ser usadas nas

análises, porém a maioria das separações analíticas são realizadas na fase reversa com a fase estacionária C<sub>18</sub>. A cromatografia líquida divide-se em quatro tipos: partição; adsorção; troca iônica e exclusão/filtração molecular. A cromatografia de adsorção fundamenta-se na interação da amostra com o adsorvente, sendo assim quanto menor a interação, o composto será separado e extraído com facilidade. A cromatografia funciona da seguinte maneira: primeiro é necessário selecionar a coluna cromatográfica (fase estacionária), seu tamanho e recheio vão depender da amostra que será analisada e para isso é necessário conhecer as características químicas do analito, após a escolha, a coluna é adicionada ao aparelho. Em seguida é necessário escolher a fase móvel que é formada por um solvente e ou uma mistura de solventes, devem ser escolhidos pensando nas características do analito, deve-se pensar no grau de polaridade do solvente e a afinidade do analito. Após a escolha da fase móvel é necessário definir as condições da corrida cromatográfica, o fluxo de injeção do solvente, a percentagem de solvente que será adicionado e o tempo total de corrida. Além de definir as fases móvel e estacionária, tem que definir a temperatura, pH e a pressão adequada para o analito. Posteriormente a escolha da condição cromatográfica injeta-se a amostra, o solvente arrastará a amostra pela coluna cromatográfica, substâncias com afinidade serão eluídas primeiro e substâncias com afinidade pela coluna cromatográfica serão eluídos por últimos, a amostra é então separada e o detector DAD vai revelar os picos de retenção das substâncias em seus respectivos comprimentos de onda com o auxílio do software do aparelho cromatográfico. (OLIVEIRA, 2013). As substâncias são identificadas após comparar os tempos de retenção dos padrões com os da amostra. Tempo de retenção é o tempo que leva para a amostra aparecer no cromatograma, desde sua injeção. É possível visualizar o sistema de UPLC na Figura 10.

**Figura 10. Sistema de UPLC**

Fonte: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>

### 2.5.9. Fitoterápicos e controle de qualidade

Desde 1978 que a Organização Mundial da Saúde reconhece oficialmente o uso de fitoterápicos. Já no Brasil a política de plantas medicinais e fitoterápicas foi implantada em 1981 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Os fitoterápicos são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como: “Substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em partes dela, na forma de extrato total ou processado, que podem ser extraídos a partir de processos diversificados e comercializados em estado líquido, sólido ou semissólido” (OMS, 2013).

Já planta medicinal é definida pela ANVISA como: “Espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” (BRASIL, 2011a).

A fitoterapia é o tratamento das doenças com a utilização de substâncias extraídas de plantas e é considerada uma das mais antigas práticas da medicina. Sua utilização é uma forma de tratamento considerada eficaz, e tornou-se popular entre as pessoas e os profissionais de saúde (CECHINEL-ZANCHETT, 2016).

O mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta até 500 milhões de dólares por ano, somente no Brasil. Há uma estimativa que, no mundo seria gasto cerca de US\$ 27 bilhões (SOUZA; MACIEL, 2010). O consumo de fitoterápicos e de plantas medicinais tem sido estimulado com base no mito “se é natural não faz mal”. Porém, ao contrário da crença popular, eles podem causar diversas reações como intoxicações, enjoos, irritações, edemas (inchaços) e até a morte, como qualquer outro medicamento (BRASIL, 200-), o que resultou na pequena quantidade de estudos pré-clínicos e clínicos com o intuito de comprovar a segurança desses produtos (CECHINEL-ZANCHETT, 2016).

Com a ampliação do consumo, exige-se a normatização do setor, com a implantação e a constante revisão de normas técnicas para a produção e comercialização de medicamentos, visando garantir a segurança no uso e a eficácia terapêutica aliada à qualidade do produto. É indispensável, um rigoroso controle de qualidade dos dados que revelam a origem de plantas medicinais utilizadas (SOUZA; MACIEL, 2010).

O uso de planta medicinal como medicamento, deve ser feito de maneira consciente, deve estar previamente validada, isto é, a sua ação terapêutica comprovada, sua toxicidade avaliada e controle de qualidade padronizado (ENDERLE *et al.*, 2018).

Plantas medicinais para manutenção ou recuperação da saúde são usadas em todo o mundo e a regulamentação do uso pode ocorrer de diversas maneiras, como: plantas medicinais, drogas vegetais notificadas, medicamento fitoterápico industrializado ou



manipulado, e fora da área farmacêutica, as plantas medicinais possuem possibilidade de uso como cosmético ou alimento (CECHINEL-ZANCHETT, 2016).

Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminações por micro-organismos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo maior segurança de uso. Os fitoterápicos industrializados devem ser regularizados na ANVISA antes de serem comercializados (BRASIL, 2011a).

Os fitoterápicos podem ser encontrados nas formas de:

Extrato:

É a preparação de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtida a partir do IFAV (insumo farmacêutico vegetal), pode sofrer tratamento preliminar e pode ser preparado por percolação; maceração ou outro método adequado e validado, utilizando solvente adequado (BRASIL, 2018).

Extrato fluido: “É a preparação líquida obtida de drogas vegetais por extração com líquido extrator apropriado ou por dissolução do extrato seco correspondente” (BRASIL, 2018).

Gel: “É a forma farmacêutica semissólida que contém um agente gelificante para fornecer viscosidade a um sistema de partículas de dimensão coloidal” (BRASIL, 2018).

Maceração: “ É o processo que consiste em manter a planta fresca ou droga vegetal, convenientemente rasurada, triturada ou pulverizada, em contato com o líquido extrator apropriado, por tempo determinado para cada vegetal ” (BRASIL, 2018).

A Farmacopeia Brasileira é o Código Oficial Farmacêutico do Brasil, onde estão estabelecidos os critérios de qualidade dos medicamentos em uso, tanto manipulados quanto industrializados, compondo o conjunto de normas e monografias de farmacoquímicos, estabelecido para o país (BRASIL, 2011b).

Em relação à regulamentação das plantas medicinais e seus derivados, esta é feita pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que tem como papel proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviço e participando da construção de seu acesso. Um dos trabalhos realizados pela ANVISA é o registro de medicamentos, os quais são submetidos a testes que vão avaliar sua eficácia, segurança e qualidade, antes de serem expostos à venda para a população. A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina a necessidade de identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. Há ainda as Resoluções Específicas (RE) que contemplam uma lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos, uma lista de registro simplificado de fitoterápicos, guias para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos e para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos (SOUZA; MACIEL, 2010).

Os medicamentos fitoterápicos devem ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos. No caso da *Thuya occidentalis*, a farmacopéia homeopática Brasileira (BRASIL, 2011b) traz informações sobre a planta, seu uso, sua identificação, modo de preparo do medicamento homeopático e informa os ensaios para controle de qualidade e de identificação da planta (Quadro 2), Como:

- Resíduo seco: Deve ser igual ou superior a 1,30% (p/V).
- Cromatografia em camada delgada: Desenvolver cromatografia empregando camada delgada de sílica-gel G.
  - Aplicar na placa, 30 µl de tintura-mãe, Fase móvel a mistura de acetato de etila-ácido fórmico anidro-água (80:10:10). Examinar à luz ultravioleta de onda longa (365 nm).
  - Aplicar sobre placa 20 µl de tintura-mãe. Desenvolver a cromatografia empregando como fase móvel a mistura de clorofórmio-tolueno (30:10). Examinar à luz natural.
  - Aplicar sobre uma terceira placa, 30 µl de tintura-mãe. Desenvolver a cromatografia empregando como fase móvel a mistura de clorofórmio-metanol (9:1). Examinar à luz ultravioleta de onda longa (365 nm) (BRASIL, 2011b).

**Quadro 2. Ensaios de identificação para *Thuya occidentalis***

	<b>Reagente</b>	<b>Reação</b>
A.	Reagente de Tollens.	Forma precipitado negro e após aquecimento aumenta a quantidade de precipitado.
B.	Acetato de chumbo a 1% (p/V).	Desenvolve-se coloração verde-amarelada.
C.	Solução de hidróxido de sódio a 10% (p/V).	A solução torna-se turva e adquire cor castanha.
D.	Solução de sulfato de cobre a 5% (p/V).	Desenvolve-se coloração verde escura.
E.	Solução de cloreto férrico a 1% (p/V).	Desenvolve-se coloração verde-escura.
F.	Reagente de Fehling.	Forma precipitado gelatinoso verde-amarelado.
G.	Solução de nitrato de prata a 1% (p/V).	Forma coloração verde-amarelada, com turvação.
H.	Solução de hidróxido de potássio a 10% (p/V).	Desenvolve-se coloração castanha, após aquecimento adquire aspecto gelatinoso.

I.	Solução de hidróxido de sódio a 10% (p/V)	Desenvolve-se coloração castanho-esverdeada com turbidez, Após aquecimento cor passa a castanho-avermelhada.
J.	Adicionar fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico concentrado.	Desenvolve-se coloração vermelho-escura.
K.	Adicionar alguns cristais de resorcinol.	Desenvolve-se coloração vermelho-escura.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2011b.

### 2.5.10. Validação de Métodos Analíticos

Validação é uma prova documental no qual todo método deve ter capaz de provar através de metodologias específicas que seus resultados são confiáveis. Há vários conceitos, um deles proposto por RIBANI *et al.*, 2004 que diz: “Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação”, já ANVISA preconiza como: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2018).

No Brasil há duas agências responsáveis por verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 166, de 24/07/2017 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 2011, estes guias devem ser seguidos para que a validação ocorra. No mundo a agência reguladora é a ICH (International Council for Harmonisation), conselho internacional de harmonização, é responsável por emitir guias e parâmetros para validações de ensaios e métodos na indústria.

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

#### **a) Seletividade**

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (Brasil, 2017). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (USA, 1999; VESSMAN *et al.*, 2001).

A seletividade é o primeiro passo numa validação. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma delas é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN *et al.*, 2001).

#### **b) Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (SWARTZ; KRULL, 1998; ICH, 2005; USA, 1999).

As diretrizes da ICH e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. Não deve incluir o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. As substâncias químicas de referência (SQR) devem ser preparadas em, no mínimo, triplicata e devem ser preparadas de maneira independente. Os cálculos devem ser realizados a partir de concentrações reais e respostas analíticas individuais. Os dados devem ser representados na forma de gráfico em função da concentração do analito, ou gráfico de dispersão de resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística e de uma equação da reta de regressão de  $y$  em  $x$ , estimada pelo método dos mínimos quadrados. E deve-se avaliar a associação linear entre as variáveis por meios dos coeficientes de correlação e de determinação. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

O método de adição do padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das

ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada (BERG; MURTA; KUGLER, 1988). O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (SNYDER; KIRLLAND; GLAJCH, 1997).

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Preparam-se soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações. Utilizando este gráfico ou a equação da curva resultante, pode-se calcular a concentração desta substância na amostra a partir da área da substância obtida no cromatograma resultante de uma injeção separada. Este método é sensível a erros de preparo das amostras e dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras e por isso deve ser feito a cada análise. (KRULLL; SWATZ, 1998; RODRIGUES *et al*, 2001).

Os métodos de quantificação não têm regras ou guias, exceto que o método final selecionado deve fornecer a melhor exatidão possível e um alto nível de precisão (RIBANI, 2004).

### c) Precisão

A precisão é avaliada pelos desvios padrões absolutos (coeficiente de variância). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (RIBANI *et al.* 2004).

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes. É um parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (MATSUDA, 2016; INMETRO, 2011; CHASIN *et al.*, 1998).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (BRASIL, 2017).

Repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-dia e pode ser expressa através do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (BRASIL, 2017).

Para a repetitividade, o INMETRO (2011) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2017) sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

A precisão intermediária (intra-dia) “ indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores” (ICH, 2005). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único



laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH e ANVISA para o cálculo de repetitividade descrita acima.

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas. (INMETRO, 2000) refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias (RIBANI, 2004).

#### **d) Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005; INMETRO, 2011). Um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (ISO, 2006).

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (2005) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (BRASIL, 2017). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão

de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

Ensaio de recuperação é definido como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOPSOM *et al.*, 1999). A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação (RIBANI *et al.*, 2004).

#### **e) Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 2005; INMETRO, 2011). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2003). O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

LQ é o menor valor determinado em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para uma dada condição analítica enquanto que limite de detecção é a menor quantidade de

analito que pode ser detectada, com segurança e sem a necessidade de uma quantificação (MATSUDA, 2016; LEITE, 1998).

O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ (RIBANI, *et al*, 2003).

#### **f) Robustez**

A robustez é um parâmetro opcional e mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em UPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. (HAYDEN, 1994).

Em UPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em  $\pm 2\%$ , o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em  $\pm 5$  °C. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, e precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

### **g) Tratamento estatístico da curva de calibração**

Qualquer que seja o método da curva de calibração, ela deve apresentar o seguinte tratamento estatístico: equação de regressão e coeficiente de correlação. (EKSBERG; EHRSSON, 1994; HENDERSON, 1993).

A análise de regressão tem o propósito desenvolver um modelo estatístico que possa ser utilizado para prever os valores de uma variável dependente ou variável resposta, com base em pelo menos uma variável independente ou explicativa. O modelo de regressão simples utiliza uma única variável numérica independente  $x$  para prever a variável numérica dependente  $y$ . A análise de correlação, ao contrário da regressão, é utilizada para medir a força da associação entre variáveis numéricas. Em uma análise de regressão envolvendo uma variável independente e uma variável dependente, cada valor é desenhado em um gráfico bidimensional chamado gráfico de dispersão. Onde observa-se a ideia superficial do tipo de relação existente entre as variáveis, onde a mais simples é uma relação linear ou retilínea. A análise de regressão linear simples significa encontrar linha reta que melhor se ajuste aos dados, que significa a tentativa de encontrar a linha reta para a qual as diferenças entre os valores reais de  $y$  e os valores previstos da linha de regressão ajustada  $\hat{y}$  sejam os menores possíveis. E é determinada por meio de uma técnica matemática chamada de método dos mínimos quadrados (LEVINE; BERENSON; STEPHAN, 2000).

Ao avaliar uma análise de regressão, deve-se ponderar se os pressupostos básicos são atendidos, são eles:

- Linearidade: descreve corretamente a relação funcional entre X e Y. Se violado a estimativa do erro aumentará, já que os valores observados não se aproximarão dos valores preditos.

- Independência de erros: garante que a variação observada na análise é devido apenas à sua associação com a variável resposta.

- Normalidade: requer que os valores de y sejam normalmente distribuídos para cada valor de x.

- Homocedasticidade: requer que variâncias dentro de cada grupo seja igual àquela dentro de todos os grupos.

Se os pressupostos forem atendidos pode-se afirmar que os resultados da análise são devido aos efeitos testados. E aumenta a confiabilidade do teste, uma vez que prova que não há tendências nos resultados (SANTANA, 2014).

Análise de resíduos é usada para avaliar a adequação do modelo de regressão que foi ajustado aos dados e avaliar se houve violação dos pressupostos e identificar outliers. Resíduos são erros estimados, medidos pela diferença entre os valores de y observados e previstos y da variável dependente para valores de x. Resíduos padronizados são cada resíduo dividido pelo seu erro padrão. E resíduos de Student são resíduos padrões ajustados para a distância do valor x médio (LEVINE; BERENSON; STEPHAN, 2000). Modelos bem ajustado de resíduos, tem uma distribuição aleatória em torno do zero; variância constante concentrado entre 2 e -2. E pouquíssimos pontos abaixo -3 e acima de +3 (MATUDA, 2017). Já outlier é “uma observação que se diferencia tanto das demais observações que levanta suspeitas de que aquela observação foi gerada por um mecanismo distinto” (HAWKINS, 1980).

A validade do método pode ser determinada por meio de um gráfico de probabilidade normal para resíduos. Onde o resíduo é representado por seu valor esperado, o qual é calculado supondo que os resíduos seguem uma distribuição normal. Testa a normalidade que será válida se os pontos estiverem localizados, ao longo de uma linha reta. Com ênfase nos valores centrais do gráfico e não os extremos, através de um gráfico QQ-plot, representa graficamente os resíduos reais no eixo X em relação aos resíduos previstos no eixo Y. Esta previsão baseia-se no pressuposto de que os resíduos foram amostrados a partir de uma distribuição gaussiana. Se a suposição de normalidade for atendida, espera-se que os pontos neste gráfico formem uma linha reta (GraphPad Software, inc. 200-).

A normalidade também pode ser avaliada por meio de uma curva de frequência, que tem a forma de sino, conhecida como curva de Gauss. As Medidas que se distribuem seguindo a curva de Gauss revelam uma tendência central: os valores se acumulam em torno de um ponto, mais ou menos próximo do centro, e a frequência diminui à medida que nos afastamos desse ponto, para a direita ou para a esquerda. Pensando em normalidade em termos de o mais comum, ou seja, o item que se apresenta com maior frequência, parece razoável usar a média aritmética para identificar esse item mais frequente, normal. (HEGENBERG, 1998) A área sob a curva deve ser igual a 1, e, portanto, a mais variável do conjunto de observações, será a mais baixa e mais larga da curva correspondente (FILHO, 2014; CABARITI, 2013).

Após a análise dos pressupostos, segue-se para a análise dos intervalos de confiança, onde se faz uma estimativa dos valores de y para valores x. Intervalo de confiança é uma estimativa de ponto da média da população. Onde a estimativa do intervalo verdadeiro da média aritmética de y varia de maneira hiperbólica, como uma função da proximidade de um dado x em relação à média e então são feitas previsões para valores de x que sejam distantes

do valor médio de  $x$ , intervalo é mais amplo é a contrapartida para fazer previsões nesses valores de  $x$ , onde se observa uma banda de confiança para as previsões. Já o intervalo de previsão prever a resposta que seria obtida para um valor individual. É a previsão de uma observação individual  $y$  a um determinado valor de  $X$  (LEVINE; BERENSON; STEPHAN, 2000).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi caracterizar o extrato hidro alcoólico de *Thuya occidentalis* usando ensaios fitoquímicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, métodos de ensaios químicos e método UPLC-DAD.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar Triagem Fitoquímica de extrato hidro alcoólicos de *Thuya occidentalis*;
- Realizar estudos de atividade antioxidante da *Thuya occidentalis* por DPPH e FRAP;
- Realizar ensaio de determinação de flavonóides totais e fenóis totais da *Thuya occidentalis* por meio de métodos cloreto de alumínio e Folin-Ciocalteu;
- Realizar ensaios de citotoxicidade in vitro usando linfócitos humanos pelo método do Alamar Blue;
- Realizar ensaios antimicrobianos pelo método da microdiluição;
- Validar método UPLC-DAD para identificação e quantificação de flavonóides da *Thuya occidentalis*;
- Propor marcadores fitoquímicos para o controle de qualidade da planta medicinal *Thuya occidentalis*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta

A planta *Thuja occidentalis* foi adquirida através da floricultura Rio verde plantas e jardins, localizada na Av. Jorge Barros, 1617, Santa Amélia, Maceió, AL, CEP: 57063-000. A exsicata pode ser vista na Figura 11.

**Figura 11. Exsicata da *Thuja occidentalis***



**Fonte:** Autora, 2019.

#### 4.1.1. Reagentes e solventes

- Carbonato de sódio – Cinética Química
- Magnésio em raspas P.A – Reagentes Analíticos Dinâmica

- Folin-Ciocalteu – Sigma Aldrich
- Ácido Sulfúrico – Sigma Aldrich
- Cloreto Férrico – Sigma Aldrich
- Hidróxido de sódio – Sigma Aldrich
- Ácido clorídrico – Sigma Aldrich
- Anidrido acético – Sigma Aldrich
- Sulfato de Sódio anidro –Sigma Aldrich
- Cloreto de Alumínio – Sigma Aldrich
- Etanol – Sigma Aldrich
- Metanol – Sigma Aldrich
- Acetato de sódio trihidratado – Sigma Aldrich
- Acetona P.A. – Sigma Aldrich
- Ácido acético glacial P.A. – Sigma Aldrich
- Cloreto férrico hexahidratado – Sigma Aldrich
- Sulfato ferroso heptahidratado – Sigma Aldrich
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) – Sigma Aldrich
- Água destilada – Laboratório da ICF/UFAL
- Trolox (Ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico) - Sigma Aldrich
- PBS – Thermo fisher scientific
- RPMI 1640 - Thermo fisher scientific
- Placa de 96 poços- Biosystems
- Linfócitos- Hospital Universitário professor Aberto Antunes
- Alamar blue - Invitrogen

## **4.2. Extração**

Galhos frescos da planta foram retirados e secados a temperatura ambiente, e então cortados em pequenos pedaços e transformadas em pó (150g) com o auxílio de um moinho (Tecnal TE 301) e então acondicionadas em um béquer de vidro com uma solução contendo 700 mL de etanol e 300 mL água na proporção de 7:3 foi adicionada ao frasco de vidro. A amostra vegetal ficou em temperatura ambiente em contato com a solução extratora por 7 dias. Em seguida foi filtrado e o solvente foi retirado através de evaporação por meio de rota-evaporador. O restante do extrato contendo 10 mL de solvente foi armazenado em recipiente apropriado, identificado e mantido em temperatura ambiente por uma semana até secar, em seguida foi armazenado em um refrigerador, perfazendo 4g de extrato bruto.

## **4.3. Preparação de amostras**

Para a preparação da Tinturade 10 mg/mL. 100 mg do extrato foi diluído em 10 mL de uma solução álcool-água 3:1(v.v). Uma alíquota então foi retirada para a realização dos ensaios.

## **4.4. Preparação das formulações**

A extração do material e o preparo das formulações foram realizadas de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010), em processo geral para a obtenção de extrato fluído e gel fluído. Foi utilizado um extrato macerado da *Thuja occidentalis*, provenientes da UFAL e d UFPE.

#### **4.5. Triagem fitoquímica**

Uma alíquota da solução estoque foi retirada e utilizada em todos os testes de Triagem. Utilizou-se um tubo como padrão contendo 1 mL da amostra, sem os reagentes, para que fosse possível comparar as mudanças de cor ocorridas nos ensaios a seguir. O ensaio foi realizado com uma amostra proveniente do extrato de *Thuja occidentalis* na concentração de 10 mg/mL. Os testes realizados segundo a metodologia de Matos (1997).

##### **2.4.1. Teste para avaliar taninos pirogálico, fenóis, e taninos flobafênicos**

No tubo 1, são adicionas três gotas de uma solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) seguido de agitação. Observar mudanças de cor e de formação de precipitados de tons escurecidos. Cor variando de azul ao vermelho é indicativo da presença de fenol; precipitado azul escuro é indicativo de tanino pirogálico; precipitado verde é indicativo de tanino flobafênico. Neste teste pode se comparar o resultado, fazendo uso de um ensaio em branco, utilizando apenas água e cloreto férrico (MATOS, 1997).

#### **2.4.2. Teste para avaliar antocianinas e antocianidina, flavonas, flavonóis, chalconas e auronas e flavononóis.**

No tubo 2 adicionar ácido clorídrico (HCl) com pH 3,0. No tubo 3 adicionar hidróxido de sódio (NaOH) com pH 11. Observar mudanças na coloração. Cor amarela indica presença de flavonas, flavonóis e xantonas; vermelho e vermelho-purpura são indicativos da presença de chalconas e auronas; cor vermelha-alaranjada indica presença de flavonóis (MATOS, 1997).

#### **2.4.3. Teste para avaliar leucoantocianidinas, catequinas e flavonas**

No tubo 4, adicionar HCl com pH 2,0. No tubo 5 adicionar NaOH com pH 11. Em seguida aquecer tubos durante três minutos. Observar mudança na coloração. Cor vermelha indica presença de leucocianidinas; cor castanha indica presença de catequinas; cor vermelha-alaranjada indica presença de flavonas (MATOS, 1997).

#### **2.4.4. Teste para avaliar flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas.**

No tubo 6, adicionar 1 mL de HCl concentrado e em seguida adicionar uma fita de magnésio. Após o término da reação, evidenciado pela efervescência. Comparar aspecto do tubo 6 com o 4 (ambos acidulados), em busca de alterações ou na intensificação da cor

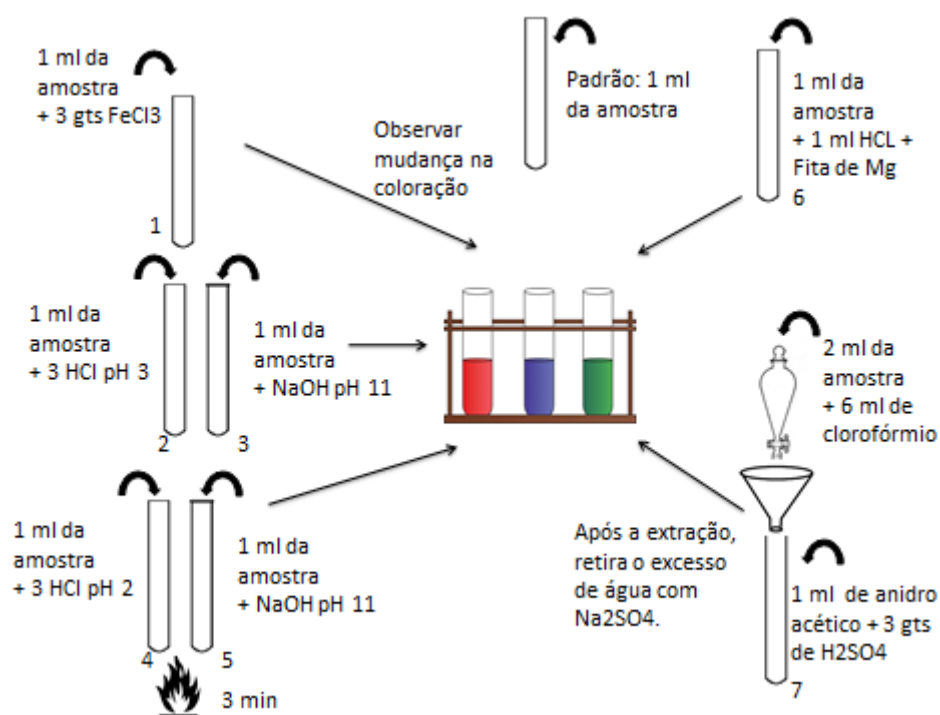
vermelha, que é indicativo para a presença de flavonóis, flavononóis, flavononas e xantonas (MATOS, 1997).

#### **2.4.5. Teste para avaliar esteroides e triterpenóides**

Extrair resíduo seco três vezes com 2 mL de clorofórmio e homogeneizar. Filtrar a solução em um tubo de ensaio (7), por gotejamento, através de um pequeno funil coberto por algodão contendo alguns decigramas de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Em seguida 1 mL de anidrido acético é adicionado, sob suave agitação, adiciona então 3 gotas de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Observar alterações na coloração. Cor azul mudando para o verde é indicativo da presença de esteróides livres; cor variando do castanho para o vermelho indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

Na Figura 12 apresenta um esquema de como o Triagem Fitoquímica foi reproduzido. Após a adição dos reagentes aos tubos de ensaio utilizados no teste, foi observado se houve mudança na coloração ou formação de precipitado e com base nos resultados foi possível dizer se há indício da presença de determinado composto ou não na amostra.

**Figura 12. Triagem Fitoquímica**



Fonte: Autora, 2019.

#### 4.6. Fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Foram preparadas soluções de ácido gálico mais Folin-Ciocalteu com concentrações de 2, 3, 4, 4,5, 5, 5,5, 6 µg/mL através dos resultados obtidos para estas concentrações, foi confeccionada a curva padrão de ácido gálico para servir de parâmetro aos resultados das amostras de Thuya.

Transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL contendo 3,5 mL de água destilada e uma alíquota de ácido gálico correspondente a cada concentração e 400 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos, acrescentaram-se 600 µl da solução de carbonato de sódio a 20%. Após o acerto do volume

final, com água, agitou-se por 5s. Decorrido o tempo de 2 h, no escuro, fez a leitura em espectrofotômetro a 760 nm em UV-VIS (Shimadzu UV-1280).

Transferiu-se uma alíquota do extrato nas seguintes concentrações 75, 100, 125, 150 µg/mL, 400 µl do reagente de Folin-Ciocalteu, 600 µL de carbonato de cálcio a 20% para um balão volumétrico, de cor âmbar, de 5 mL contendo 3,5 mL de água destilada, completou o volume final com água. Após 2 h em temperatura ambiente e no escuro, foi realizada a leitura no espectrofotômetro descrito acima. Foi preparado uma solução em branco para comparação, contendo todos os reagentes, exceto a amostra.

#### **4.7. Flavonóides Totais**

Construiu-se uma curva padrão utilizando uma solução metanólica de quercetina com as concentrações de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/mL. Transferiu-se uma alíquota para um balão volumétrico de 5 mL contendo 4 mL de metanol, uma alíquota correspondente a cada concentração de quercetina e 100 µL da solução de AlCl<sub>3</sub> a 5%. Após o acerto do volume final com metanol, agitou-se por alguns segundos. Decorridos o tempo de 30 minutos, no escuro, fez-se a leitura espectrofotômetro a 425 nm em UV-VIS (Shimadzu UV-1280).

Transferiu-se uma alíquota da tintura da amostra, as concentrações usadas foram 400, 600, 800, 1000, 1200 µg/mL e 100 µL da solução de AlCl<sub>3</sub> para um balão volumétrico de 5 mL, de cor âmbar, contendo 4 mL de metanol. Completou o volume com metanol. Após 30 minutos, no escuro, foi realizada a leitura no espectrofotômetro descrito acima. Foi preparando uma solução em branco para comparação, contendo todos os reagentes, exceto a amostra.



#### 4.8. Atividade antioxidante com DPPH

Para medida da capacidade sequestrante do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila), preparou-se uma solução 4 mM de DPPH em etanol, foi adicionado 2 mL desta solução em um balão de 5 mL e em seguida foram adicionadas alíquotas correspondentes da amostra do extrato de *Thuya occidentalis* para obter concentrações de 4, 10, 20, 80, 200 µg/mL. Em seguida deixou a reação ocorrer no escuro em temperatura ambiente por 30 min. Após o termino da reação foi realizada a leitura no UV-VIS (Shimadzu UV-1280), em triplicata, na faixa de 518 nm, permitindo calcular a percentagem de inibição de DPPH. Foi preparado uma solução em branco para comparação, contendo todos os reagentes, exceto a amostra. A capacidade de sequestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a equação abaixo:

Capacidade de sequestro de radical DPPH (%) =  $100 - ((\text{ABS amostra} - \text{ABS branco}) * 100) / \text{ABS controle}$ .

Onde: ABS Amostra = Absorbância da solução da amostra em DPPH; ABS Controle = Absorbância da solução referência em DPPH e ABS branco = Absorbância da solução da amostra sem DPPH.

Trolox (Ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico) é uma análogo solúvel em água da vitamina E. É um antioxidante usado como referência para medir a capacidade antioxidante de uma amostra, é frequentemente medida usando a absorbância no

espectro UV (colocar equipamento) ao observar mudanças na coloração. O Ensaio de poder de redução do íon ferro (FRAP) e o ensaio de poder sequestrador do radical DPPH<sup>\*</sup> são ensaios que medem a capacidade antioxidante e que utilizam o Trolox como padrão (BENZIE; STRAIN, 1996; FIRUZI *et al.*, 2005).

Foi feita uma curva de calibração da solução etanólica de Trolox na concentração de 1 a 20 µg/mL, seguindo os mesmos procedimentos da preparação da amostra de DPPH citado acima.

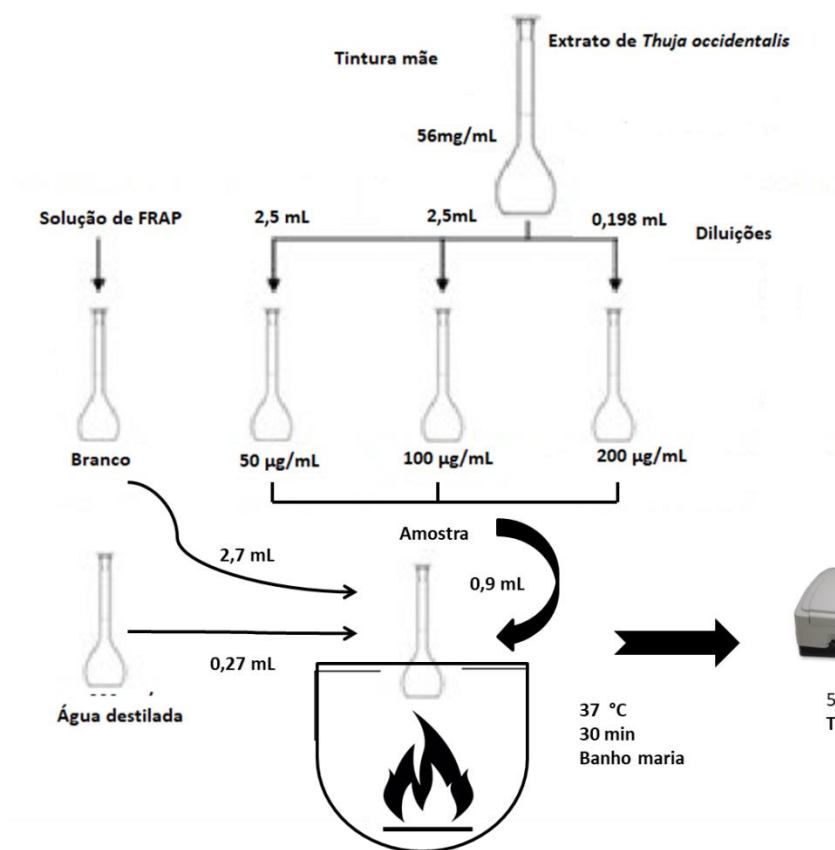
#### **4.9. Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo método de redução do ferro - FRAP**

A solução de FRAP foi preparada seguindo a metodologia de Firuzi *et al.* (2005), onde 2,7 mL da solução de FRAP, 0,09 mL amostra, 0,27 mL água destilada foram misturados e deixados no banho Maria a 37 °C durante 30 min, após o término da reação foi realizada a leitura, em triplicata, no UV-VIS (Shimadzu UV-1280) na faixa de 595 nm, permitindo assim calcular a absorbância da reação de redução do reagente FRAP. Foram utilizadas concentrações da amostra do extrato de *Thuya occidentalis* de 50, 100 e 200 µg. A Figura 13 representa um resumo da metodologia de FRAP utilizada.

A Curva padrão foi construída a partir da solução padrão de Sulfato Ferroso 2 mM, em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 90 µL de cada solução de sulfato ferroso (500 à 2.000 µM) para tubos de ensaio, acrescentada 270 µL de água destilada e misturada com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizada em agitador de tubos e mantida em banho-

maria a 37 °C. A leitura (595 nm) foi realizada após 30 minutos da mistura e o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

**Figura 13. Esquema visual da metodologia de FRAP**



**Fonte:** Autora, 2019.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotar a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, determinar a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante total (AAT), deve-se substituir na equação da reta, a absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x (Equação 1) corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso.

**Equação 1. Equação da reta do extrato de *Thuya occidentalis* por FRAP**

$$y = ax + b$$

Onde,

y = Absorbância correspondente a 1.000 µM de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM

A partir do resultado encontrado (x) na Equação 1 dividir por 1.000 para ter o valor em gramas; em seguida fazer a divisão por 1.000 para encontrar o resultado final (Z).

Equação 2 que é expresso em µM sulfato ferroso/g do extrato de *Thuya occidentalis* (BRITO *et al.*, 2006).

**Equação 2. Resultado final (Z)**

$$Z = (x / 1.000 \times 1) / 1.000$$

**4.10. UPLC-DAD (cromatografia líquida de alto desempenho acoplado ao detector de arranjo diodo)**

O perfil cromatográfico das amostras de extratos de *Thuya occidentalis* foi realizado utilizando uma cromatografia líquida de alto desempenho acoplado ao detector de arranjo diodo (UPLC-DAD) da Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: a bomba de alta pressão (Nexera modelo LC-20ADXR), desgaseificador (modelo DGU-20A3R), Auto-injetor

(modelo SIL-20AXR), coluna cromatográfica forno (CTO-20A), detectores de arranjo de diodos (modelo EPDM-20A) e detector de ultravioleta (modelo SPD-M20A), um controlador (Modelo CBM-20A) e um software Shimadzu Labsolution.

A separação dos compostos fenólicos, flavonóides e demais constituintes ocorrerá utilizando uma coluna Júpiter (Phenomenex®) de fase reversa (C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm; 5 µm) e pré-coluna C<sub>18</sub>(Phenomenex®). A fase móvel que consistiu de solvente A (0.1% ácido acético em água Milli-Q) e o solvente B (metanol), bombeado num fluxo de 0,8 mL/min. Temperatura do forno de 30 – 32 °C. O gradiente de eluição inicial consistiu de solvente B (25%) com uma variação da percentagem para 60% no tempo 13 min., 95% no tempo 27.01 minutos, em seguida voltando a 25 % no tempo 32.01 minutos e volta à condição inicial a 37.01 min. Perfazendo o tempo total de 37 min de leitura. A robustez foi determinada com ácido acético a 0,1, 0,2 e 0,3%.

#### **4.11. Validação do método UPLC-DAD**

Para a avaliação da adequação de todo o procedimento para a identificação e quantificação de flavonóides no extrato hidro alcoólico de *Thuya occidentalis*. O método desenvolvido foi validado de acordo com as diretrizes de validação da ANVISA e do ICH (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

a) Seletividade: A seletividade do método UPLC foi estabelecida pela injeção do extrato de *Thuya occidentalis* na faixa de concentração (200, 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL) em comparação com o tempo de retenção e espectro UV-vis de cada substância eluída na coluna cromatográfica com os padrões analíticos dos flavonóides. A seletividade dos padrões

também foi avaliada pelo método na concentração de (5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL) pelo método de adição de padrão analítico e da calibração externa, que também foram utilizados para confirmar a eluição dos picos de flavonóides utilizados para determinar os flavonóides presentes no extrato de *Thuya occidentalis*.

b) Exatidão e precisão: A preparação da curva de calibração usando o método de adição de padrão e calibração externa também foi usada para determinar a recuperação e precisão do método em 3 dias diferentes de análise.

Para medir a precisão foi determinado o teor de cada flavonóide individualmente, em triplicata, em uma amostra de Thuya de concentração conhecida. Esta medida foi realizada em condições de repetibilidade. A precisão foi expressa em função do desvio padrão e do coeficiente de variação (MATSUDA, 2006; CHASIN *et al.*, 1198).

A exatidão foi determinada através do cálculo da taxa de recuperação para o método cromatográfico utilizado. A recuperação foi obtida pelo método de adição do padrão e calibração externa, em três níveis de concentração. As amostras foram preparadas em três níveis de concentração na faixa de 50% (500 µg/mL), 100% (1000 µg/mL) e 150% (1500 µg/mL) de quantidade nominal da amostra, em triplicata para cada nível. As análises foram independentes e completas desde a preparação da amostra até o cálculo do resultado (MATSUDA, 2006; INMETRO, 2011). A recuperação e precisão foram calculadas da seguinte forma:

Recuperação%:  $\text{recuperação da concentração nominal} = (\text{valor medido médio} / \text{valor nominal}) \times 100$ .

A precisão foi calculada como % de desvio e segue  $\text{\% de desvio} = [(\text{valor medido} - \text{valor verdadeiro}) / \text{valor verdadeiro}] \times 100$ .

c) O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram definidos como a menor quantidade de composto analisado que dá um pico reproduzível com variações de três vezes ( $3\sigma$ ) e dez vezes ( $10\sigma$ ), respectivamente (BRASIL, 2017). LD e LQ foram determinados a partir de resultados do DP médio e da inclinação da curva de calibração. As análises para cada concentração foram realizadas em triplicata. O cálculo foi feito pela fórmula (SWARTZ; KRULL, 1998; VIAL; JARDY, 1999).

$$\text{LD} = \frac{\text{desvio padrão médio}}{\text{inclinação da curva de calibração}} \times 3$$

$$\text{LQ} = \frac{\text{desvio padrão médio}}{\text{inclinação da curva de calibração}} \times 10$$

d) linearidade: visando determinar a capacidade do método cromatográfico em gerar resultados proporcionais a concentração da amostra, foi verificada a linearidade do mesmo. A linearidade estabelece a relação existente entre a resposta do sistema cromatográfico e a concentração do analito que está sendo analisado (MATSUDA, 2006; BRENDOLAN, 2000). A linearidade foi determinada pela obtenção da curva de calibração dos flavonóides padrões. Foram feitas duas curvas, uma com a mistura de padrões (Calibração externa) contendo: catequina, myricitrina, quercitrina e amentoflavona, em solução com metanol nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . E outra com 200  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de *Thuja*

*occidentalis* contaminado com os padrões (Adição do Padrão) citados acima, nas mesmas concentrações.

Em seguida foram filtradas em membrana porosa e analisadas por UPLC conforme item 4.10. E por meio dos tempos de retenção obtidos no UPLC e nos espectros de absorção UV-DAD foi possível identificar e quantificar os flavonóides contidos no extrato hidroalcoólico e nas formulações de *Thuja occidentalis*.

A curva de cada padrão de flavonóide obtida pelo método de calibração externa e pela adição de padrão foram plotadas pelo método dos mínimos quadrados resultou numa curva de dispersão com padrão linear. A linearidade dos métodos foi verificada fazendo a análise de regressão representada pela equação da reta, e através do coeficiente de correlação (MATSUDA, 2006; CHASIN *et al.*, 1998). A linearidade e adequabilidade do método foram avaliadas por meio de modelos estatísticos, como: método de resíduos de Student, que determina se o ajuste de modelo não teve violação aparente no pressuposto de igual variância a cada nível de X (homocedasticidade). Os resíduos foram então plotados em um histograma de frequência e observou se a normalidade não foi violada. A normalidade também foi avaliada através de uma curva de distribuição normal QQ-Plot com os valores de resíduos previstos e reais, a normalidade é tida como verdadeira se os resíduos seguirem um padrão linear. Foi então avaliada se houve interferência na análise de regressão por meios dos intervalos de confiança e de previsão. Para assim, determinar quais dos dois métodos podem ser usados para quantificar os flavonóides presentes nos extratos e nas formulações de *Thuja occidentalis*.



e) Robustez: A robustez do método foi avaliada usando a menor concentração da amostra do extrato de *Thuja occidentalis* (500 $\mu$ g/mL). Os parâmetros de temperatura e pH do método UPLC foram alterados, a Temperatura variou  $\pm 1^\circ$  e o pH  $\pm 0,1$ .

#### 4.12. Citotoxicidade em linfócitos

Foi utilizada uma linhagem celular de linfócitos humanos, foram cultivadas em meio de cultura RPMI, contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Para os ensaios biológicos todos os extratos foram dissolvidos e metanol, e diluídos em meio de cultura para a concentração teste desejada (1, 10, 25, 50, 100 e 250 $\mu$ g/mL).

As células foram lavadas com PBS e centrifugadas três vezes e em seguida 90 $\mu$ l de células em meio de cultura RPMI foram adicionadas numa microplaca de 96 poços, as células foram mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C por 20 min e em seguida foram adicionadas 10  $\mu$ l das soluções diluídas do extrato de *Thuja occidentalis*. E retornaram para a estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C, onde permaneceram por 24h. Após 24h, foram adicionadas 10  $\mu$ L do reagente alamar blue (Resazurina), o teste foi desenvolvido conforme metodologia descrita por Ahmed, Gogal e Walsh (1994), com modificações. Após 2h de reação dentro da estufa, as placas foram lidas em leitor de microplaca ELISA, nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm, para que possa identificar as duas formas do reagente (oxidado e não oxidado). Recomenda-se subtrair a absorbância a 600 nm por 570 nm para alcançar a absorbância específica, devido a sobreposição das duas formas do reagente alamar blue (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994). O teste foi feito em triplicata. E foi usado como controle,

resazurina 100% oxidada, RPMI mais as células, e RPMI mais a resazurina (ARANHA, 2014).

#### **4.13. Atividade antimicrobiana**

As cepas de bactérias padronizadas foram da American Type Culture Collection (ATCC) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Ágar Mueller Hinton, Ágar BHI, Ágar nutriente e resazurina foram os meios de cultura utilizados nos testes microbiológicos.

O extrato de hidro alcóolico de *Thuya occidentalis* foi fracionado em acetado, clorofórmio e hexano. Obtendo: Fração acetado que foi solubilizada em Clorofórmio e evaporada; Fração clorofórmica solubilizada em metanol e evaporada; Fração acetato; Fração clorofórmica (10mg/mL); Fração hexânica (formou um óleo). Foram pesados respectivamente 30 mg, 20 mg, 20 mg e 10 mg e 100 µL e solubilizados em 1 mL de metanol. O teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou ensaio de microdiluição em caldo foi realizado usando microplacas de cultura (96 poços) contendo 100 µL/poço de caldo de Muller Hinton, seguindo o procedimento descrito por CLSI (2006), com algumas modificações. Uma solução estoque foi preparada à 10 mg/mL usando etanol à 96°GL e diluída em caldo Muller Hinton (1250 µg/mL). Diluições seriadas (na razão de 1:2) foram preparadas em concentrações variando de 9,765 à 1250 µg/mL, em microplacas. Cerca de 30 µL de suspensão bacteriana (aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL) foram adicionadas aos poços contendo 100 µL de caldo Muller Hinton com diferentes concentrações finais de Thuya (concentrações variando de 8,91 à 1086,96 µg/mL). As microplacas foram incubadas 36 °C

por 24 horas. Os resultados foram observados após adição de 40  $\mu$ L de solução de resazurina (100 $\mu$ g/mL) e reincubação à 36 °C por 2 horas. Pontos azuis na microplaca mostram crescimento de Bacterias e pontos rosas mostram ausência de crescimento bacteriano. Diluições seriadas de etanol 96 °GL em caldo Muller Hinton broth foram realizadas como controle negativo. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

#### **4.14. Estatística**

Os resultados foram estatisticamente processados usando ANOVA, Teste t-student. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes de se  $p < 0.05$ . Os gráficos foram obtidos por meio do GraphPad Prism versão 8.0.2 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Os resultados foram dispostos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extratos de *Thuya occidentalis*

Foram obtidos 4g (2.67% de rendimento) de extrato bruto e o extrato apresentou cor amarela escura e característica oleosa, com odor característico do vegetal, de aspecto similar aos estudos de Naser *et al.* (2005) e Dubey e Batra (2009a).

Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula:

$$Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100.$$

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%);  $P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g);  $P_{folhas}$  = Peso das folhas frescas ou secas (g).

### 5.2. Triagem Fitoquímica

O Traigem confirmou a presença de flavonóides, catequinas e esteróides no extrato de *Thuya occidentalis*. Durante o ensaio o tubo 3 apresentou uma leve intensificação da cor amarela após a adição do reagente, sendo indício da presença de flavonas, flavonóis e xantonas. O tubo 6 apresentou um aro de cor avermelhada na superfície, sendo indício de flavonóis, flavononóis, flavonas e xantonas. O tubo 4 mudou a coloração para parda, indicando catequinas. O tubo 7 apresentou uma coloração esverdeada indicando a presença de

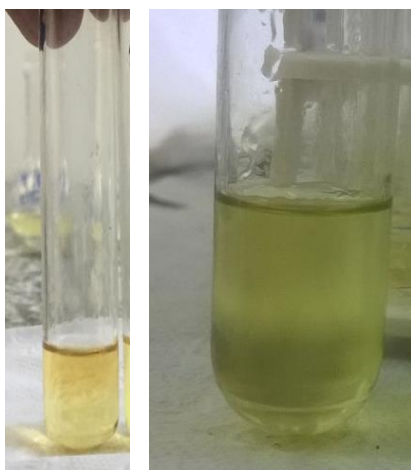
esteroides. Não houve alteração na coloração nos outros tubos após a adição dos reagentes. A Tabela 1 ilustra os resultados obtidos no ensaio, com as duas amostras. Na Figura 14 é possível visualizar os resultados do Triagem. Na Tabela 2 há um resumo dos compostos fitoquímicos identificados no ensaio de Triagem.

**Tabela 1. Resultado da Triagem Fitoquímica**

Tubo	Extrato de <i>Thuya occidentalis</i>
1	-
2	-
3	Intensificação do amarelo
4	Parda
5	-
6	Vermelha
7	Esverdeada

\*(-) – não houve mudança na coloração.

**Figura 14. Resultados do tubo 6 e 7, respectivamente.**



**Tabela 2. Constituintes analisados na Triagem Fitoquímica da *Thuya occidentalis***

Teste de Triagem	Extrato <i>Thuya occidentalis</i>
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos flobafênicos	-
Antocianina	-
Antocianidina	-
Leucocianidinas	-
Tripernóides	-
Esteroides	+
Catequinas	+
Flavanonas	+
Flavonas	+
Xantonas	+
Flavonóis	+
Auronas	-
Chalconas	-
Flavononóis	+

\*(-) significa ausência; (+) significa presença.

Os resultados deste trabalho se assemelham com os estudos conduzidos por Naser *et al.* (2005) e Alves *et al.* (2014) onde são relatados a presença de flavonóides, catequinas e esteroides nos extratos de *Thuya occidentalis*, entre elas amentoflavona, catequina, quercetina, quercitrina, myricitrina, kaempferol, esteroides e entre outras substâncias, já citadas anteriormente no Quadro 1, página 23.

### 5.3. Flavonóides totais e Fenóis totais

A curva de calibração dos flavonóides totais foi desenvolvida com concentrações de quercetina durante três dias de leitura. Para que fosse possível determinar as concentrações de flavonóides totais no extrato de *Thuya*, através da validação dos parâmetros de linearidade,

precisão inter-dia (precisão intermediária) e exatidão. O Gráfico 1 ilustra a curva de calibração da quercetina, resultante da média de absorbância dos três dias de leitura. O método apresentou linearidade, precisão intermediária e exatidão na faixa de 4 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando uma curva padrão de quercetina em sete pontos de concentrações, que resultou na equação linear,  $y=0,046x - 0,0189$ , onde  $y$  é a absorbância e  $x$  é a concentração;  $R^2$  (coeficiente de correlação) = 0,99; o coeficiente linear =  $-0,0189$  e coeficiente Angular =  $0,046$

A curva de calibração dos fenóis totais foi desenvolvida com concentrações de ácido gálico durante três dias de leitura. Para que fosse possível determinar as concentrações de fenóis totais no extrato de Thuya, através da validação dos parâmetros de linearidade, precisão inter-dia (precisão intermediária) e exatidão. O Gráfico 2 ilustra a curva de calibração do ácido gálico, resultante da média de absorbância dos três dias de leitura. O método apresentou linearidade, precisão intermediária e exatidão na faixa de 2 a 6  $\mu\text{g/mL}$ , e a equação linear obtida  $y = 0,153x - 0,086$ , onde  $y$  é a absorbância e  $x$  é a concentração;  $R^2$  (coeficiente de correlação) = 0,99; o coeficiente linear =  $-0,086$  e coeficiente angular =  $0,153$ .

Os resultados dos ensaios podem ser observados nas Tabela 3. A partir dos valores de absorbância de luz ultravioleta em ambos os testes, é possível calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variância dos resultados das amostras para flavonóides e fenóis totais. Com o auxílio das formulas é possível calcular a quantidade flavonóides e fenóis totais nas amostras.

Através da curva de ácido gálico, obteve-se a fórmula ( $y = 0,153x - 0,086$ ), a partir da média de Absorbância de cada concentração da amostra é subtraída por  $-0,086$  e dividida por

0,153, se tem a concentração equivalente de ácido gálico na amostra, ou seja, de fenóis. A média de fenóis presentes da amostra de *Thuya occidentalis* é de 2.85%.

É possível determinar a concentração equivalente de quercetina na amostra, ou seja, de flavonóides. Através da curva de quercetina, obteve-se a fórmula da equação da reta ( $y=0,046x - 0,0189$ ). A média de absorbância de cada concentração da amostra é o y na equação, ao realizar o cálculo matemático proeminente da equação tem-se a média de flavonóides presentes na amostra de *Thuya occidentalis*, 0.95%.

Os resultados atendem as exigências da ANVISA (BRASIL, 2017) com valores inferiores a 5% para coeficiente de variação e com coeficiente de correlação igual a 0,99. Apresentou uma precisão intermediária de 0.51% para fenóis e de 0.15% para flavonóides.



Gráfico 1. Curva de Calibração da Quercetina.

**Curva de calibração da Quercetina**

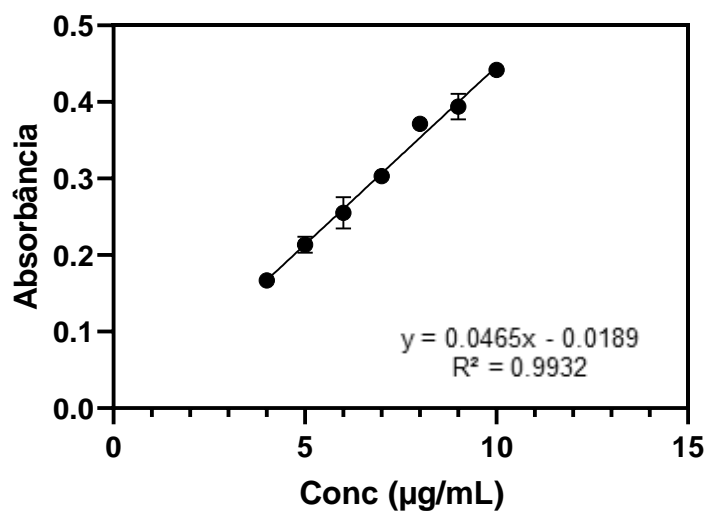
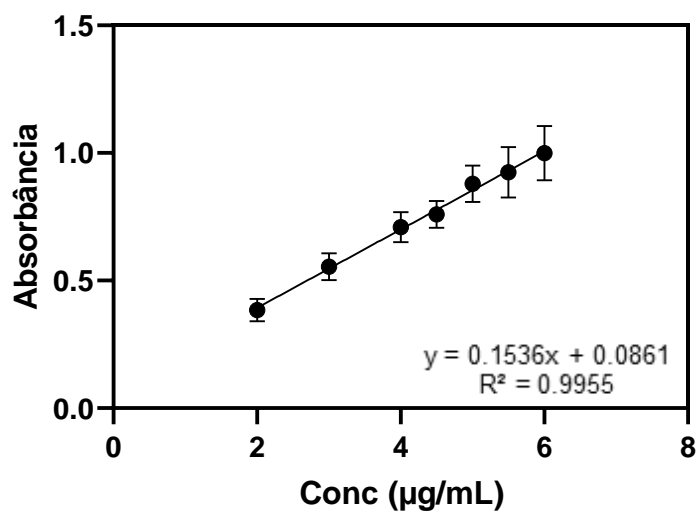


Gráfico 2. Curva de calibração do ácido gálico

**Curva de calibração do Ácido Gálico**



**Tabela 3. Determinação de conteúdo de flavonóides totais e fenóis totais no extrato de**

<i>Thuya occidentalis</i>			
Extrato de <i>Thuya occidentalis</i>	( $\mu\text{g/mL}$ )	CV%	Flavonóides %
1200 $\mu\text{g/mL}$	10.25	0.11	0.85
1000 $\mu\text{g/mL}$	8.65	0.08	0.87
800 $\mu\text{g/mL}$	7.36	0.07	0.92
600 $\mu\text{g/mL}$	6.73	0.15	1.12
Extrato de <i>Thuya occidentalis</i>	( $\mu\text{g/mL}$ )	CV%	Fenóis %
200 $\mu\text{g/mL}$	5.32	0.51	2.66
150 $\mu\text{g/mL}$	4.14	0.04	2.76
125 $\mu\text{g/mL}$	3.80	0.01	3.04
100 $\mu\text{g/mL}$	2.76	0.05	2.76
75 $\mu\text{g/mL}$	2.26	0.06	3.00

\*Cada valor é expresso em média dos valores medidos em triplicata; CV%: coeficiente de variância;  
 Flavonóides %: Percentagem de flavonóides totais; Fenóis %: percentagem de fenóis totais.

Com relação à quantidade de Fenóis Totais, Dubey e Batra (2009b) relatou em seu estudo concentrações equivalentes a 123  $\mu\text{g/mL}$  de fenóis totais no extrato de *Thuya occidentalis*, e demonstrou que o vegetal apresenta compostos fenólicos em sua composição em maior quantidade. Assim como no estudo citado, este trabalho evidenciou que o extrato de *Thuya* apresenta concentrações de fenóis totais em proporção maior que a de flavonóides.

#### 5.4. Atividade antioxidante por DPPH e FRAP

Os resultados obtidos no ensaio de DPPH podem ser visualizados na Tabela 4, onde é possível observar a relação dose resposta dependente, à medida que a concentrações de

extratos aumentam há um aumento da inibição do DPPH, mostrando que os extratos possuem atividade antioxidante ao consumir o reagente, diminuindo a absorbância das amostras a luz ultravioleta emitida pelo aparelho de UV-VIS na faixa de 518 nm.

**Tabela 4. Atividade antioxidante do Extrato de *Thuya occidentalis* e do Trolox por DPPH**

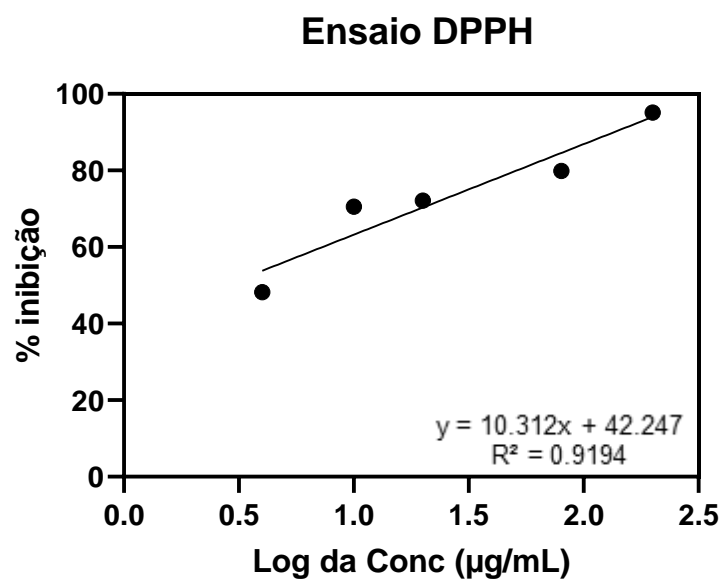
Atividade antioxidante do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> por DPPH				
Conc. µg/mL	Média ABS	DP	CV%	Inibição DPPH %
4.0	0.522	0.001	0.111	48.244
10.0	0.320	0.000	0.000	70.538
20.0	0.305	0.001	0.189	72.115
80.0	0.235	0.001	0.426	79.892
200.0	0.101	0.001	0.570	95.125
Atividade antioxidante do Trolox por DPPH				
Conc. µg/mL	Média ABS	DP	CV%	Inibição DPPH %
1.0	0.332	0.000	0.000	18.985
2.5	0.194	0.001	0.297	52.578
5.0	0.035	0.001	1.634	91.378
10.0	0.030	0.001	1.903	92.598
20.0	0.028	0.001	2.087	93.249

\*Cada valor é expresso em média dos valores medidos em triplicata; DP: Desvio padrão; CV%: coeficiente de variância; Flavonóides %: Percentagem de flavonóides totais; Fenóis %: percentagem de fenóis totais.

O Gráfico 3 foi construído com base no percentual de absorbância e nas concentrações das amostras (na base de log). A partir da equação linear da reta, o IC<sub>50</sub> foi calculado. IC é a concentração inibitória capaz de reduzir 50% do reagente DPPH. A amostra apresentou um IC<sub>50</sub> de 5,647 mg/mL, o que significa que a concentração de 5,647 mg/mL da amostra do extrato de *Thuya occidentalis* é capaz de inibir 50% do reagente DPPH e o extrato de *Thuya occidentalis* obteve máxima atividade antioxidante na concentração de 200 µg/mL. Os

coeficientes de variação estavam abaixo de 5% dentro dos parâmetros da ANVISA (BRASIL, 2003).

**Gráfico 3. Curva de absorbância do radical DPPH % do extrato de *Thuya occidentalis***

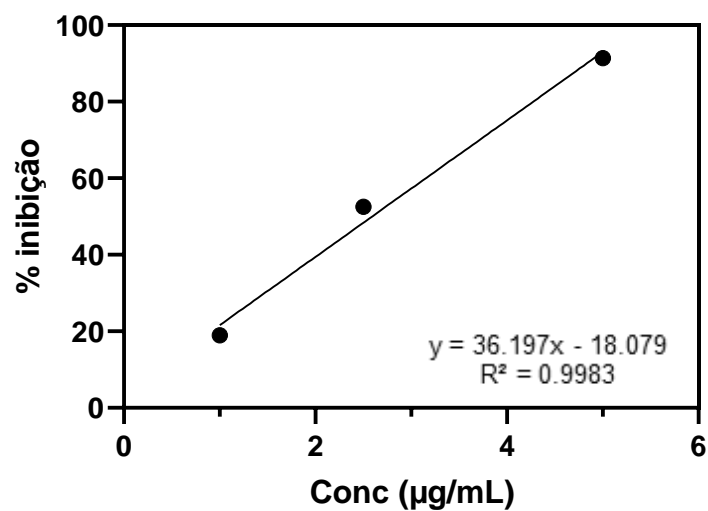


Trolox apresentou máxima atividade antioxidante na concentração de 5 µg/mL com 91.38 % de inibição e IC<sub>50</sub> de 1.882 µg/mL. Os resultados da atividade antioxidante do Trolox pelo método de DPPH pode ser visualizado na Gráfico 4.

Gráfico 4. Curva de absorbância do radical DPPH % da substância de referência

Trolox

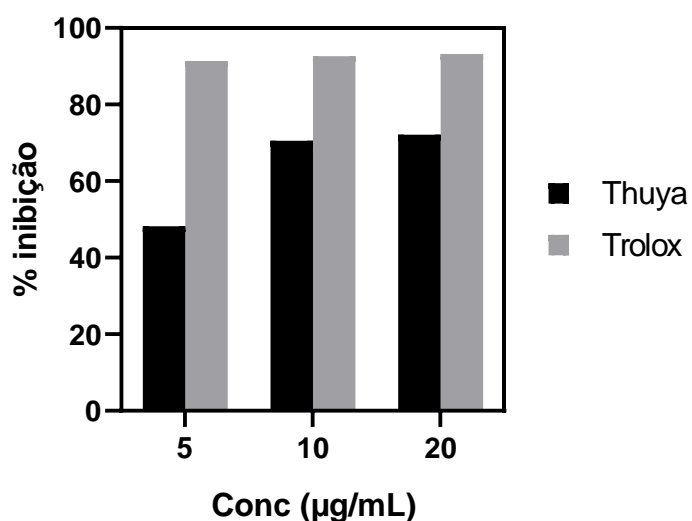
Ensaio Trolox



No Gráfico 5 é possível comparar o potencial de inibição do Trolox com o potencial de inibição de extrato de *Thuya occidentalis*, onde houve uma diferença significativa entre eles ( $p=9.2 \times 10^{-05}$ )(ANOVA), ou seja, apesar da *Thuya occidentalis* ter apresentado ótima atividade antioxidante, ela é menos potente que a substância de referência, Trolox.

**Gráfico 5. Capacidade de redução do radical DPPH do Trolox e do extrato de *Thuya occidentalis***

**Capacidade de Redução do Radical DPPH %**

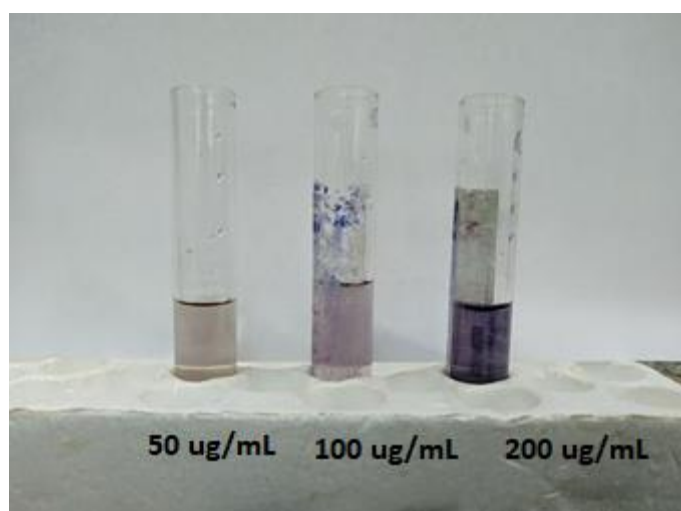


Entretanto, vários pesquisadores avaliaram a atividade antioxidante por meio do Radical DPPH e obtiveram resultados semelhantes em relação à ótima atividade antioxidante de maneira concentração dependente do extrato de *Thuya occidentalis*. O estudo dirigido por Jasuja *et al.* (2015) evidenciou propriedade sequestradora de elétrons pelo método de DPPH com inibição de  $89.79 \pm 0.296\%$  à  $300 \mu\text{g/mL}$  e  $\text{IC}_{50}$  de  $124.11 \mu\text{g/mL}$ . Já Dubey e Batra (2009a) demonstrou uma inibição de DPPH de  $73.346 \pm 1.040\%$  a  $300\mu\text{g/mL}$  quando comparado com Vit. C a  $5 \text{ mM}$   $78.296 \pm 0.708$ ,  $\text{IC}_{50}$   $202.457\mu\text{g/mL}$ .

A excelente atividade antioxidante, com inibição do radical DPPH superior a 70%, pode ser devido à presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonóides, no extrato de *Thuya occidentalis*.

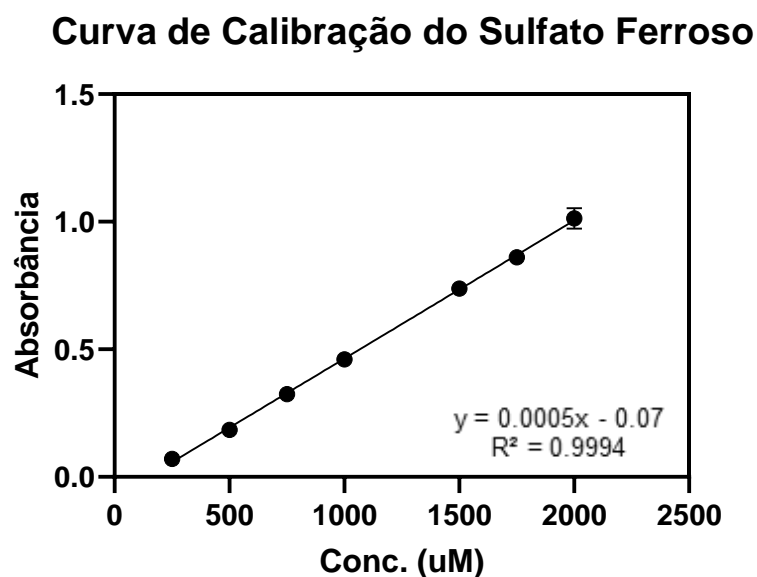
Outro meio de avaliar a atividade antioxidante é pelo método de FRAP. A avaliação da atividade antioxidante da *Thuya occidentalis* pela reação de redução do reagente de FRAP é evidenciada pela mudança na coloração, como pode ser visualizada na Figura 15 onde é possível ver a coloração azul escura, o que indica que o extrato de *Thuya occidentalis* possui substâncias em sua composição capazes de reagir com reagente FRAP e reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ .

**Figura 15. Resultado do extrato de *Thuya occidentalis* após a reação de Redução do Reagente FRAP**



A curva de calibração usando sulfato ferroso resultou na equação linear  $y = 0.0005x - 0.07$ , com coeficiente de correlação  $R^2 = 0.9994$ , como pode ser visto no Gráfico 6.

Gráfico 6. Curva de calibração do Sulfato ferroso



Os resultados de absorbância do extrato de *Thuya occidentalis* após a reação de FRAP pode ser visto na Tabela 5. Os resultados geraram uma curva linear (Gráfico 7), cuja equação foi  $y = 0.0022x - 0.048$ ,  $R^2 = 0.9999$ . A partir desta equação procedeu-se para os cálculos, seguindo a Equação 1 e Equação 2. Os coeficientes de variação estavam abaixo de 5% dentro dos parâmetros da ANVISA (BRASIL, 2017).

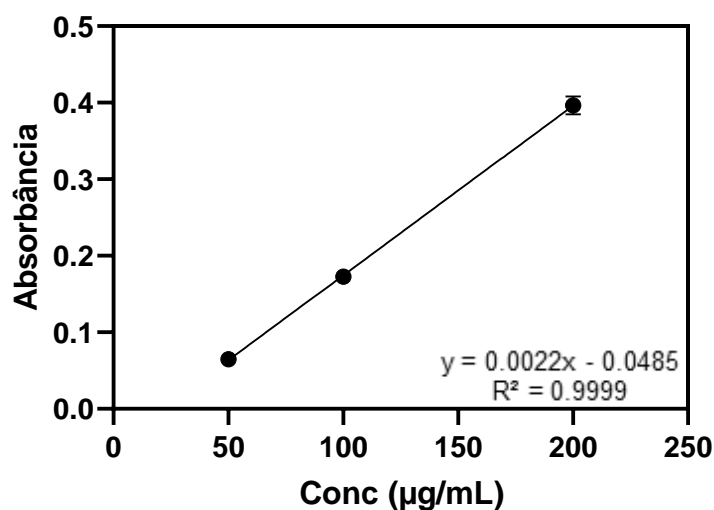
**Tabela 5. Resultado das absorbâncias do extrato de *Thuya occidentalis* por FRAP**

Atividade antioxidante do extrato de <i>Thuya occidentalis</i> por FRAP						
Conc. µg	ABS	ABS	ABS	Média	DP	CV%
50	0.065	0.062	0.067	0.0640	0.003	3.932
100	0.168	0.170	0.180	0.1720	0.006	3.738
200	0.384	0.398	0.408	0.3970	0.012	3.037

\*Cada valor é expresso em média dos valores medidos em triplicata; DP: Desvio padrão; CV%: coeficiente de variação; Flavonóides %: Percentagem de flavonóides totais; Fenóis %: percentagem de fenóis totais.



**Gráfico 7. Atividade antioxidante do extrato de *Thuya occidentalis* por FRAP**



Foi determinado assim que no extrato de *Thuya occidentalis* há uma quantidade equivalente a 5,269 mM de sulfato ferroso por grama de Thuya, que é capaz de reduzir 50% do reagente FRAP.

Sendo assim, ao analisar os dois testes, DPPH e FRAP, é possível afirmar que a *Thuya occidentalis* possui atividade antioxidante, que pode ser devido a sua composição fitoquímica cuja há presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonóides: rutina, catequina, quercetina, myricitrina, quercitrina e amentoflavona.

Halliwell e Wiseman (1996) associaram os efeitos antioxidantes naturais de vegetais ao ácido ascórbico, ácidos fenólicos e carotenoides.

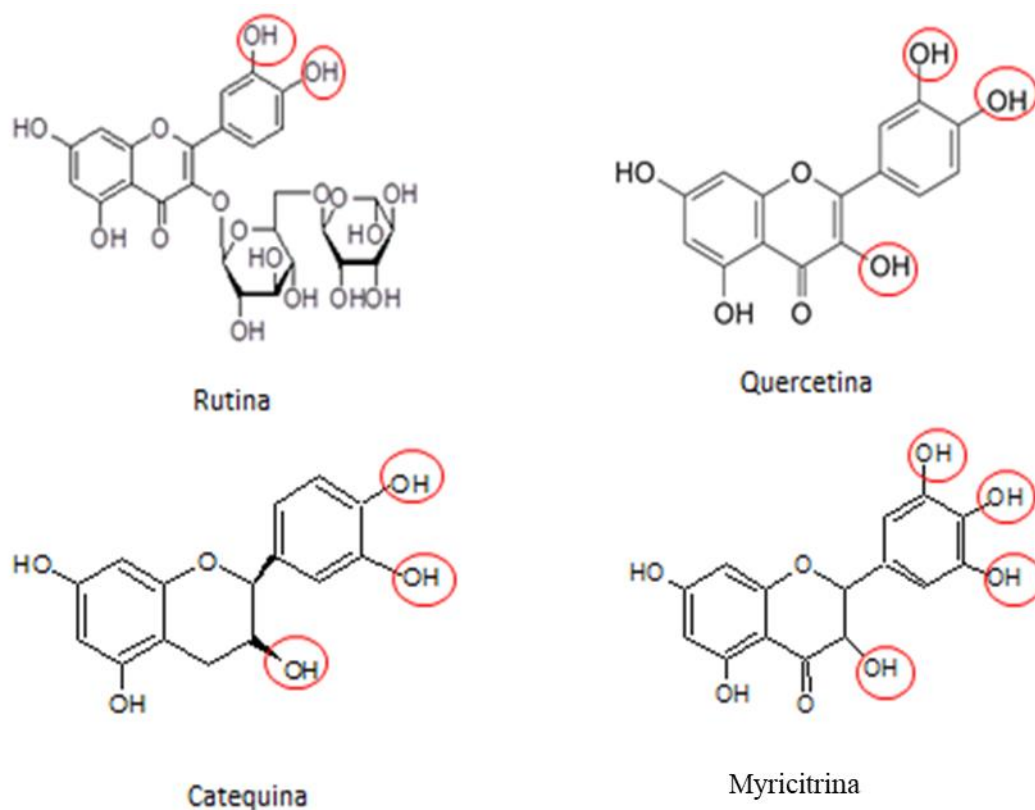
O estudo de Domitrovic *et al.* (2015), envolvendo myricitrina, relatou uma forte atividade contra o radical DPPH<sup>•</sup> e o radical NO<sup>•</sup>, bem como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 1,31 ±0,19, 21,54 ±0,29 e 28,46 ±0,67 µg/mL).

Já o estudo de Li *et al.* (2016) demonstrou que tanto a quercitrina quanto a isoquercitrina podem reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  para o  $\text{Fe}^{2+}$  de maneira concentração dependente na faixa de 0,0 a 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , e verificou que ambas também podem eliminar diretamente radicais livres ao reduzir os radicais DPPH•, pelo método de DPPH. Com os valores de  $\text{IC}_{50}$ , a isoquercitrina ( $\text{IC}_{50}$  78,16  $\pm$  4,83  $\mu\text{M}$ ) exibiu uma atividade de eliminação mais forte de  $\text{O}^{2-}$  do que a quercitrina ( $\text{IC}_{50}$  87,99  $\pm$  5,43  $\mu\text{M}$ ). Este resultado indicou que a inclusão de um grupo 6''-OH leva a um aumento na atividade antioxidante dos flavonóides glicosídeos (LI *et al.*, 2016).

Outro estudo envolvendo flavonóides mostrou que Rutina, quercetina, fisetina, myricitrina e catequina tem boa atividade antioxidante, com altos valores de FRAP. Segundo Firuzi *et al.* (2005), três deles pertencem à subclasse de flavonóis e possuem em suas estruturas químicas a combinação do grupo 3-hidroxi, 2,3-dupla ligação e 4-oxo no anel C e o grupo catecol no anel B, o que indica que esses grupos funcionais podem ser responsáveis pela capacidade de redução.

Estudos sugerem que a presença de hidroxilas em  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  do anel heterocíclico e ou catecol no anel B do Flavonóide favoreçam a atividade antioxidante, pela capacidade doadora de elétrons e de suportar deslocação em torno do Anel Aromático (DORNAS *et al.*, 2007; FERREIRA; OLIVEIRA; SOUZA, 2008). Na Figura 16 é possível visualizar algumas estruturas de flavonóides e suas respectivas hidroxilas.

**Figura 16. Estrutura de Flavonóides e suas respectivas hidroxilas**



Fonte: Autora, 2019.

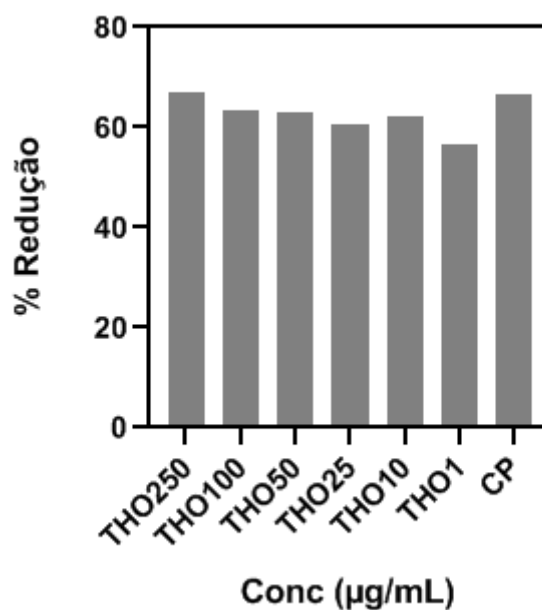
### 5.5. Citotoxicidade *in vitro*

A percentagem de viabilidade celular foi obtida através de cálculo da média aritmética das triplicatas e normalizada de acordo com a fórmula: % viabilidade celular = (Absorbância das células das amostras – Absorbância do branco/ Absorbância de células controle negativo – Absorbância do branco) x 100 (ZAMBUZI, 2012).

A análise dos dados permite observar que a adição do extrato nas culturas de linfócitos por 24h não alterou o número de células viáveis totais. Tantos os linfócitos sem

extrato quanto os linfócitos tratados com extrato de *Thuja occidentalis* tiveram aproximadamente 60% de células viáveis após 24h. Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre células expostas e não expostas ao reagente Alamar Blue. Sendo assim o extrato não é tóxico para os linfócitos em nível celular durante o período de 24h, uma vez que ao se basear na mudança de coloração das células vivas, a mudança da cor azul para rosa (redução da resazurina para resorufina) indica que a integridade da membrana não se altera após 24h de exposição ao reagente e ao extrato *Thuja occidentalis* nas concentrações usadas. Os resultados podem ser visualizados no gráfico abaixo.

**Gráfico 8. Viabilidade celular de linfócitos tratados com extrato de *Thuja occidentalis* usando pelo teste da Resazurina**



\*CP: Meio de cultura + linfócitos; THO: extrato de *Thuja occidentalis* entre 1-250 µg/mL

Um estudo realizado por Gohla *et al.* (1989) conforme citado por Joseph *et al.* (2013) demonstrou que extratos de *Thuja* são capazes de induzir células T a se diferenciar em CD4,

e assim aumentando interleucina-2 (IL-2). O que sugere, que a Thuja apresenta em sua composição química substâncias capazes de manter a imunidade. E embora o teste *in vitro* seja útil como uma triagem toxicológica inicial, apenas esse teste, não prova é suficiente de que o extrato não seja tóxico em humanos, sendo necessário a realização de testes adicionais, como: de mutagenicidade e/ou genotoxicidade como meio de investigar o potencial citotóxico real de um fármaco ou fitoterápico (HOUGHTON *et al.*, 2007). Além de que a capacidade redutora (atividade antioxidante) do extrato pode interferir nos resultados.

## 5.6. Atividade antimicrobiana

Analisando os dados da CIM foi observado que a fração TOC apresentou boa atividade contra três cepas, exceto para *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as frações (TOAC, TOCM, TOA, TOC e TOH) apresentaram boa atividade contra *E. coli*. Já o óleo da fração hexânica (TOH) teve boa atividade contra as quatro cepas, mas não foi possível calcular o CIM, uma vez que a massa do óleo não foi calculada. Os resultados podem ser vistos na tabela abaixo.

**Tabela 6. Atividade antimicrobiana das frações do extrato de *Thuja occidentalis* pelo método de microdiluição**

Código	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM(μL/mL)				
<b>Fração acetado</b>					
<b>sol. Clorofórmio</b> <b>(30 mg/mL)</b>	TOAC	1024	1024	<128	2048

<b>Fração cloroformica sol. Metanol (20mg/mL)</b>	TOCM	2048	2048	<128	2048
<b>Fração acetato (20mg/mL)</b>	TOA	1024	1042	<128	2048
<b>Fração clorofórmica (10mg/mL)</b>	TOC	256	516	<128	2048
<b>Óleo da fração hexânica 100 µl/mL</b>	TOH	inibição nas 5 diluições testadas	segunda diluição foi a CIM	inibição nas 5 diluições testadas	inibição nas 5 diluições testadas

A fração TOH que inibiu o crescimento das quatro cepas de bactérias estudadas, obteve resultado semelhante ao estudo de Jirovetz *et al.* (2006) conforme citado por Jasuja *et al.* (2015), onde o óleo essencial extraído da planta *Thuya occidentalis* foi estudado e observou que os dois isômeros  $\alpha$ -Tujona e  $\beta$ -Tujona do monoterpene estavam em maior quantidade e foram altamente efetivas ao inibir bactérias gram-negativas *P. aeruginosa* e medianamente efetivas contra *S. aureus* e *E. coli*.

TOC é mais susceptível a *S. aureus* que a *P. aeruginosa*, em concentrações mais baixas foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* (Gram-positiva), em relação à *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativo). Esta observação tem sido relatada antes na literatura (STEPANOVIC *et al.*, 2003).

A variação nos resultados microbiológicos entre as frações pode ser explicada devido as diferentes polaridades dos solventes usados para se obter as frações de *Thuya*. A atividade antimicrobiana pode ser devido à presença dos compostos fenólicos, flavonóides encontrados no extrato de *Thuya occidentalis*, como catequinas, myricitrina, quercitrina, rutina e amentoflavona, e além do fato que óleo extraído da *Thuya occidentalis* é rico em óleos

essências, principalmente do monoterpeno Tujona, que é tido por estudos como o principal metabólito ativo responsável pela atividade biológica a *Thuya* (NASER *et al.*, 2005).

Andrade (2010) conforme citado do Almeida (2013) diz que a atividade antimicrobiana pode ser devido aos compostos fenólicos que podem ativar ou aumentar a atividade da lisozima, enzima responsável pela desestabilização da parede celular bacteriana. Devido às diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas as bactérias gram-positivas são consideradas mais sensíveis aos agentes antibacterianos, já que possuem uma parede celular composta por peptidoglicanos, enquanto que as bactérias Gram-negativas possuem uma camada adicional rica em lipopolissacáridos, o que dificulta a lise de suas paredes (Mizoerva *et al.*, 1997).

Os resultado do estudo batem com realizado por Tsiri *et al.* (2009), Jahan *et al.* (2010) e Jirovetz *et al.* (2006) conforme citado por Jasuja *et al.* (2015) onde o extrato de *Thuya occidentalis* obteve atividade contra as bactérias: *Solmonella sp.*, *Enterobactercloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexenari*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis*, *Citrobacter*, *Yersinia*.

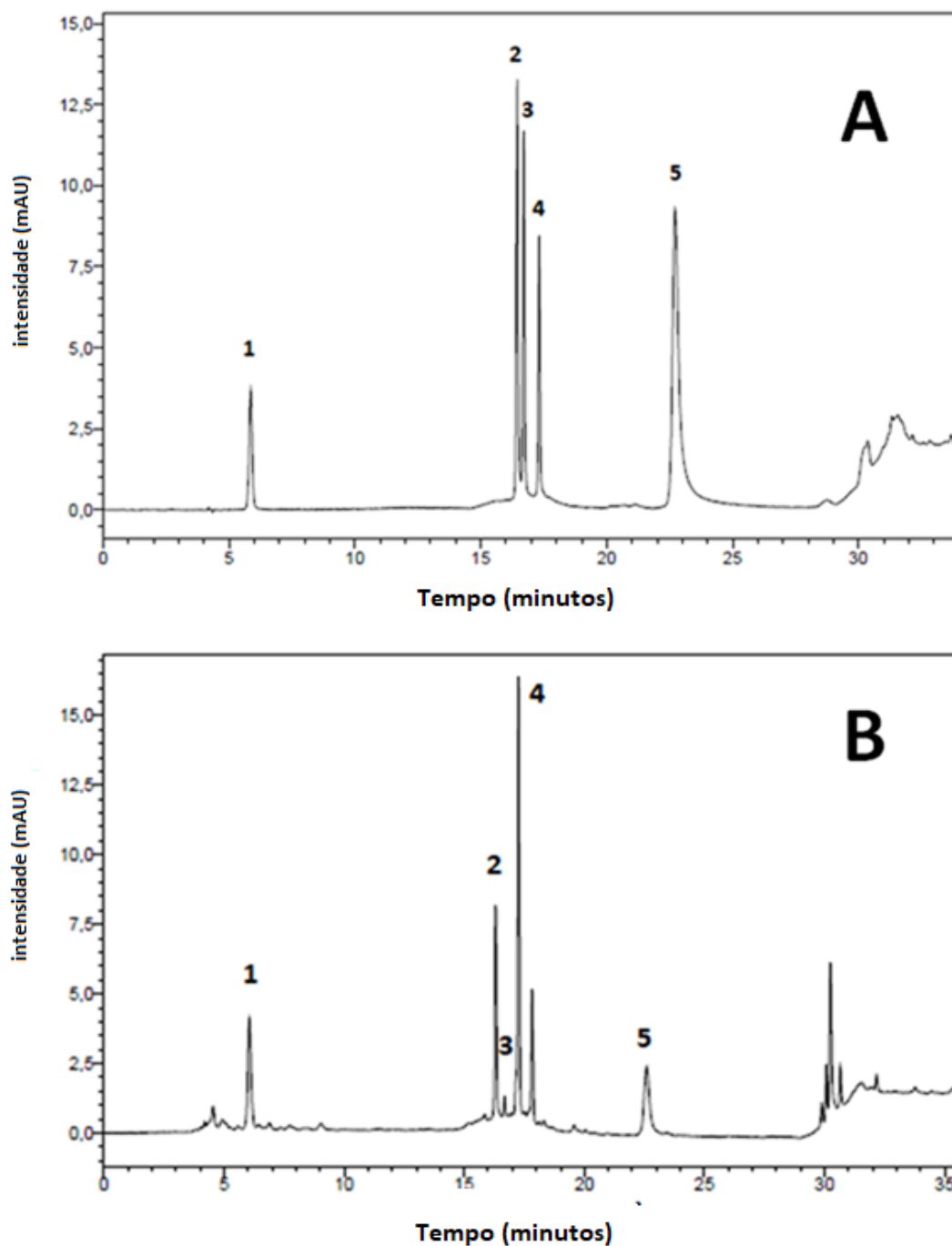
### **5.7. Perfil cromatográfico do extrato de *Thuya occidentalis***

Por meio de UPLC-DAD-UV é possível identificar e quantificar substância presentes nos extratos da planta. Para isso é necessário utilizar padrões para que exista uma comparação entre os picos de retenção de cada substância, assim permitindo sua identificação. Os seguintes flavonóides: catequina, myricitrina, quercetina, rutina, quercitrina e amentoflavona

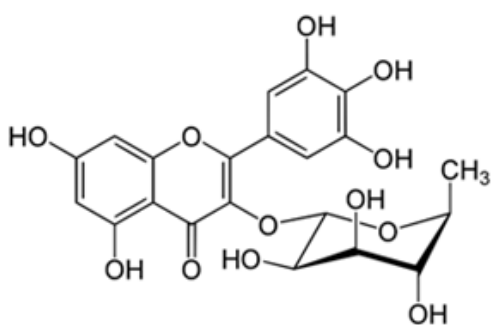
foram utilizados como padrões. A partir do tempo de retenção dos padrões é possível comparar com o tempo de retenção dos picos das substâncias presentes no extrato. O extrato de *Thuya occidentalis* submetido à UPLC-DAD-UV e exibiu picos semelhantes aos flavonóides usados como padrões, confirmando a presença destes no vegetal. A Figura 17 representa o perfil cromatográfico do extrato de Thuya e a Figura 18 a estrutura química dos flavonóides identificados. Ao comparar o tempo de aparecimento dos picos dos flavonóides padrões com as substâncias presentes no extrato, foi possível identificar a presença dos seguintes flavonóides: catequina, myricitrina, quercitrina e amentoflavona.



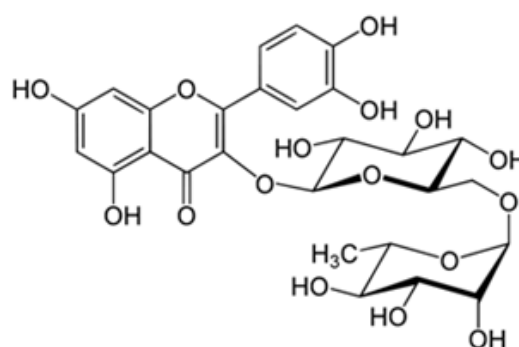
Figura 17. Perfil cromatográfico da mistura padrões analíticos na concentração de 40 µg/mL (A) e extrato de *Thuya occidentalis* na concentração de 2000 µg/mL. (B) a 310 nm. Os flavonóides (1) Catequina, (2) Myricitrina, (3) Rutina, (4) Quercitrina e (5) Amentoflavona foram identificados por meio de espectrômetro DAD-UV-Vis ao comparar com os padrões analíticos nas mesmas condições cromatográficas.



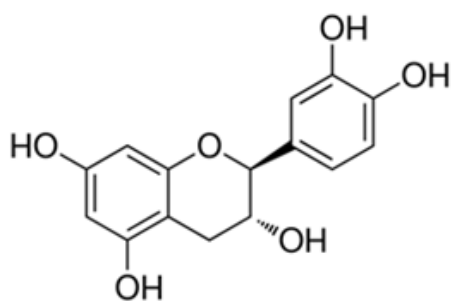
**Figura 18. Estrutura dos flavonóides identificados por UPLC-DAD**



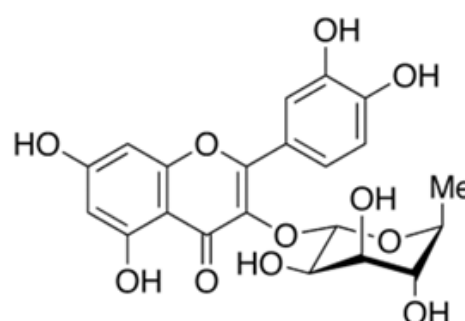
**Miricetrina**



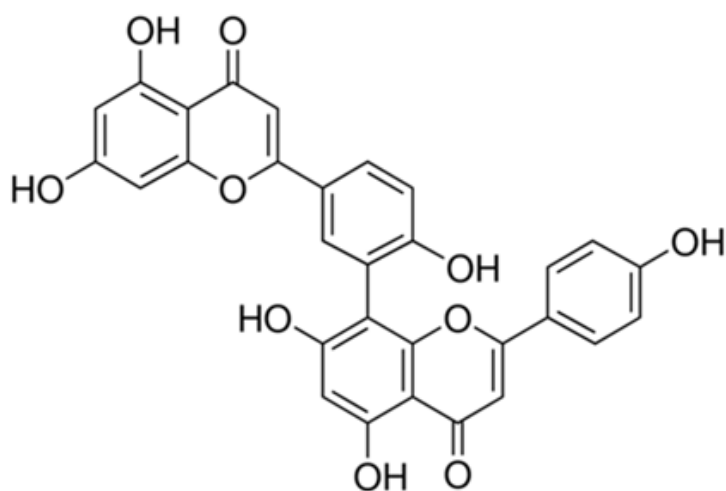
**Rutina**



**Catequina**



**Quercetrina**



**Amentoflavona**

## 5.8. Validação do método UPLC-DAD-UV

### 5.8.1. Seletividade

Não foram encontrados picos interferentes no tempo de retenção dos flavonóides durante a injeção do metanol diluente no sistema. Os tempos de retenção dos flavonóides presentes no extrato de *Thuja occidentalis* foram confirmados comparando seus tempos de retenção com os obtidos de cada flavonóide co-injetado. Todos os flavonóides foram resolvidos uns dos outros. O método forneceu a separação da linha de base para todos os flavonóides, como mostrado na Figura 17. A faixa de 275 nm é melhor para identificar catequinas e 345 nm myricitrina, quercitrina e amentoflavona, por isso utilizamos a faixa 310nm que é intermediária e pode-se identificar todos os flavonoides. Com exceção da quercetrina o método foi seletivo para todos os flavonóides, tanto na mistura de padrões quanto no extrato da *Thuja occidentalis*. Na Figura 17.A entre 15-17 min há três flavonóides eluindo em intervalados de tempo curtos, o que é observado também na Figura 17.B onde no extrato, há um pequeno aumento da linha de base e a formação de um pequeno ombro, o que sugere que há outra substância coeluindo com a quercetrina.

### 5.8.2. Limite de detecção e limite de quantificação e linearidade

A sensibilidade do método foi avaliada por LD e LQ. Foi determinado pela menor quantidade de flavonóides presentes no extrato de *Thuja occidentalis* em amostras enriquecidas. O LD dos flavonóides ficou na faixa de 0.244 a 0.886 µg/mL (Calibração

externa) e 0.273 a 1.171  $\mu\text{g/mL}$  (adição de padrão), não houve diferença significativa entre os dois métodos, o que indica que ambos os métodos são sensíveis.

A linearidade do método UPLC-DAD foi determinada pela curva resposta obtida dos padrões de flavonóides injetados, pelos métodos da calibração externa e da adição do padrão. Na Tabela 7 é possível visualizar as equações lineares obtidas e seus respectivos coeficientes de correlação, que apresentaram valores na faixa de 0,99, que segundo a ANVISA (BRASIL, 2017) um coeficiente de correlação maior que igual 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, já o INMETRO (2011) considera um valor acima de 0,90. As curvas dos padrões tiveram comportamento linear e com coeficiente de correlação de 0.9912, 0.9984, 0.9999, 0.9999, respectivamente para catequina, myricitrina, quercetina, quercitrina e amentoflavona, pelo método da calibração externa e pelo método de adição do padrão, catequina, myricitrina, quercetina, quercitrina e amentoflavona, tiveram coeficiente de correlação, respectivamente de 0.9922, 0.9985, 0.9915, 0.9989. Uma correlação próximo de 1 é uma forte indicação da existência de um relacionamento linear entre os resíduos e seus valores esperados sob a suposição de normalidade ser considerada satisfatória (SOUZA, 2019).

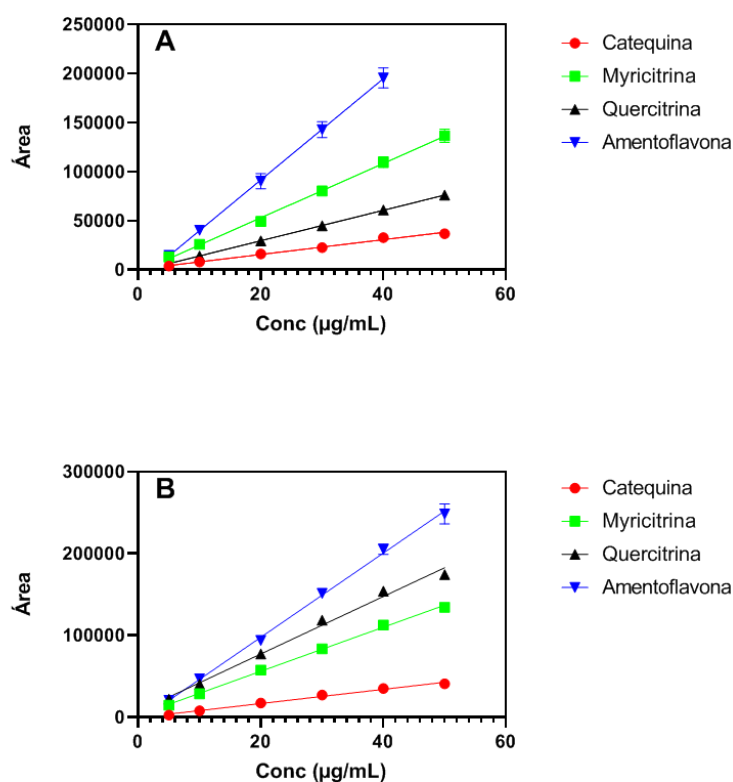
**Tabela 7. Determinação da regressão linear LQ e LD dos flavonóides de *Thuya occidentalis***

Linearidade pelo método da calibração externa				
Flavonóides	Equação linear	Coeficiente de correlação ( $r^2$ )	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Myricitrina	$y = 2773.4x - 2738.2$	0.9984	0.774	2.580
Quercitrina	$y = 1551.1x - 1623.3$	0.9999	0.886	2.952

Amentoflavona	$y = 5159.7x - 11846$	0.9999	0.647	2.155
Catequina	$y = 755.58x + 291.77$	0.9912	0.244	0.812
Linearidade pelo método de adição do padrão				
Myricitrina	$y = 2694.3x + 2054.1$	0.9985	0.273	0.910
Quercitrina	$y = 3515.4x + 6798.5$	0.9915	0.519	1.731
Amentoflavona	$y = 5273.9x - 7324.7$	0.9989	0.314	1.045
Catequina	$y = 865.73x - 802.14$	0.9922	1.171	3.904

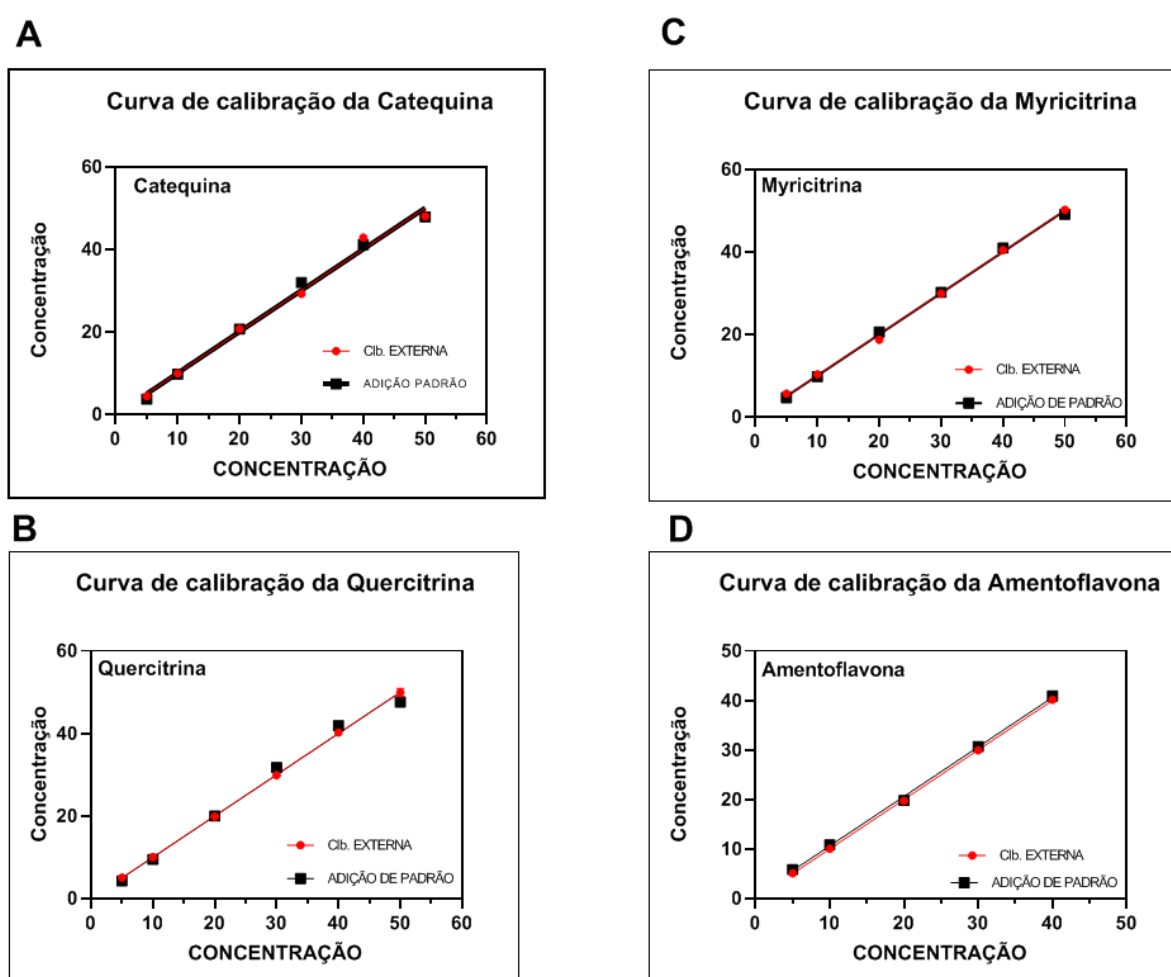
Sendo assim o método é linear, Gráfico 9, é possível visual a curva obtida das injeções dos padrões dos flavonóides, que foram usadas como base para calcular os demais parâmetros de validação.

**Gráfico 9. Curva de Calibração dos padrões de flavonóides pelo método da calibração externa (A) e adição do padrão (B)**



As curvas individuais obtidas pelos padrões nos dois métodos podem ser vistas no gráfico abaixo.

**Gráfico 10. Curva de calibração dos padrões de flavonóides pelos métodos da calibração externa e da adição de padrão.**



Através do Teste de T, usando GraphPad Prism versão 8.0.2 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA), não houve diferença significativa entre o

método de calibração externa e adição do padrão, para nenhum dos flavonóides. E ambos os métodos podem ser usados para quantificar os flavonóides presentes nos extratos e nas formulações de *Thuja occidentalis*.

Sendo assim os pressupostos de linearidade foram analisados através de métodos estatísticos para averiguar se as curvas lineares obtidas dos padrões de flavonóides pelos métodos de calibração externa e adição do padrão, estão adequadas e ajustadas.

Ao avaliar a linearidade da curva da catequina pelos dois métodos calibração externa e adição de padrão, ambos foram lineares (Gráfico 11), e o ajuste de modelo não teve violação aparente no pressuposto de igual variância a cada nível de X. A frequência dos resíduos não violou o pressuposto de normalidade, uma vez que possuem formato aproximado de sino. A Distribuição normal QQ-Plot dos resíduos formou um padrão em torno da linha, o que é evidência de que a normalidade não foi violada, e pontos da curva estão dentro dos intervalos de confiança e de previsão. Entretanto ao analisar os métodos, é possível observar que os resultado se distribuem melhor em torno da linha de distribuição pelo método de adição do padrão e possui uma tendência central, onde na Gráfico 12.D é possível ver que o sino é mais aberto em relação ao sino obtido pelo método da calibração externa, englobando todos os pontos sendo assim o método da adição do padrão é mais adequado para quantificar catequinas contidas no extrato e nas formulações de *Thuja occidentalis*.

**Gráfico 11. Linearidade do flavonóide catequina e suas respectivas bandas de confiança e previsão.**

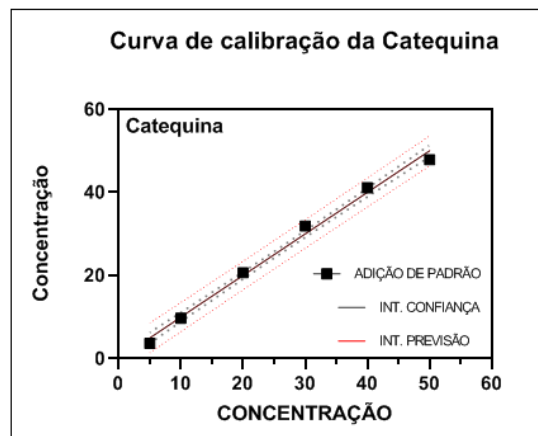
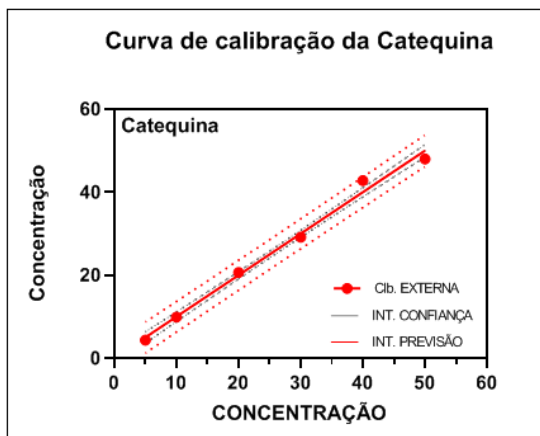
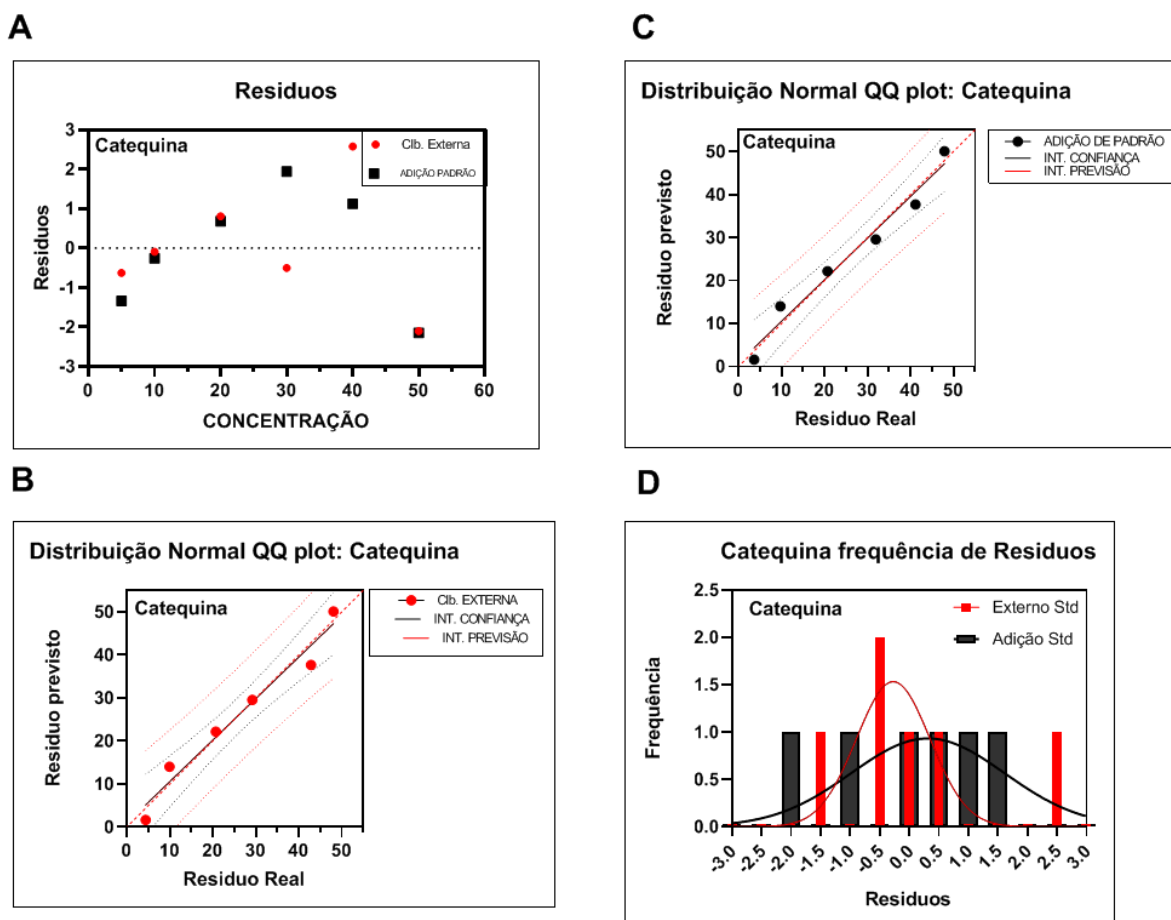




Gráfico 12. Análise de Resíduos do flavonóide Catequina



\* A: resíduos student gerados pela curva; B: Distribuição normal de resíduos estimados, pelo resíduos real e o previsto no método da calibração externa e C: pelo método de adição do padrão; D: histograma da frequência dos resíduos.

Ao avaliar a linearidade da curva da quercitrina pelos dois métodos calibração externa e adição de padrão, ambos foram lineares (Gráfico 13), e o ajuste de modelo não teve violação aparente no pressuposto de igual variância a cada nível de X. A frequência dos resíduos não violou o pressuposto de normalidade. A Distribuição normal QQ Plot dos resíduos formou um padrão em torno da linha, o que é evidência de que a normalidade não foi violada, e os pontos estão dentro dos intervalos de confiança e de previsão. Entretanto ao analisar os dois métodos,

é possível observar que há uma maior dispersão dos resultados pelo método de adição do padrão onde no Gráfico 14 B é possível ver que o sino é mais aberto em relação ao sino obtido pelo método da calibração externa, sendo assim os resultados variam menos para o método da calibração externa.

**Gráfico 13. Linearidade do flavonóide Quercitrina e suas respectivas bandas de confiança e previsão.**

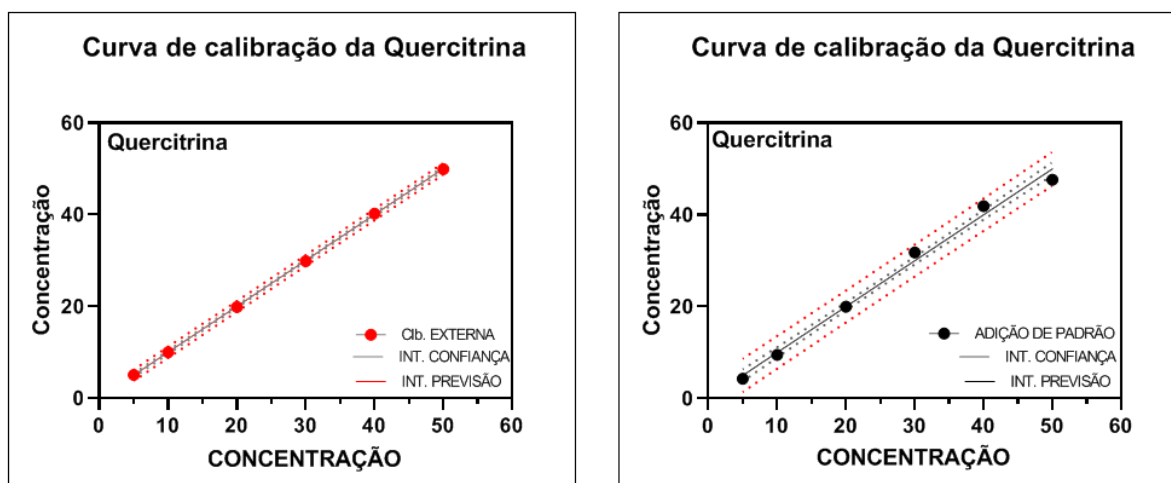
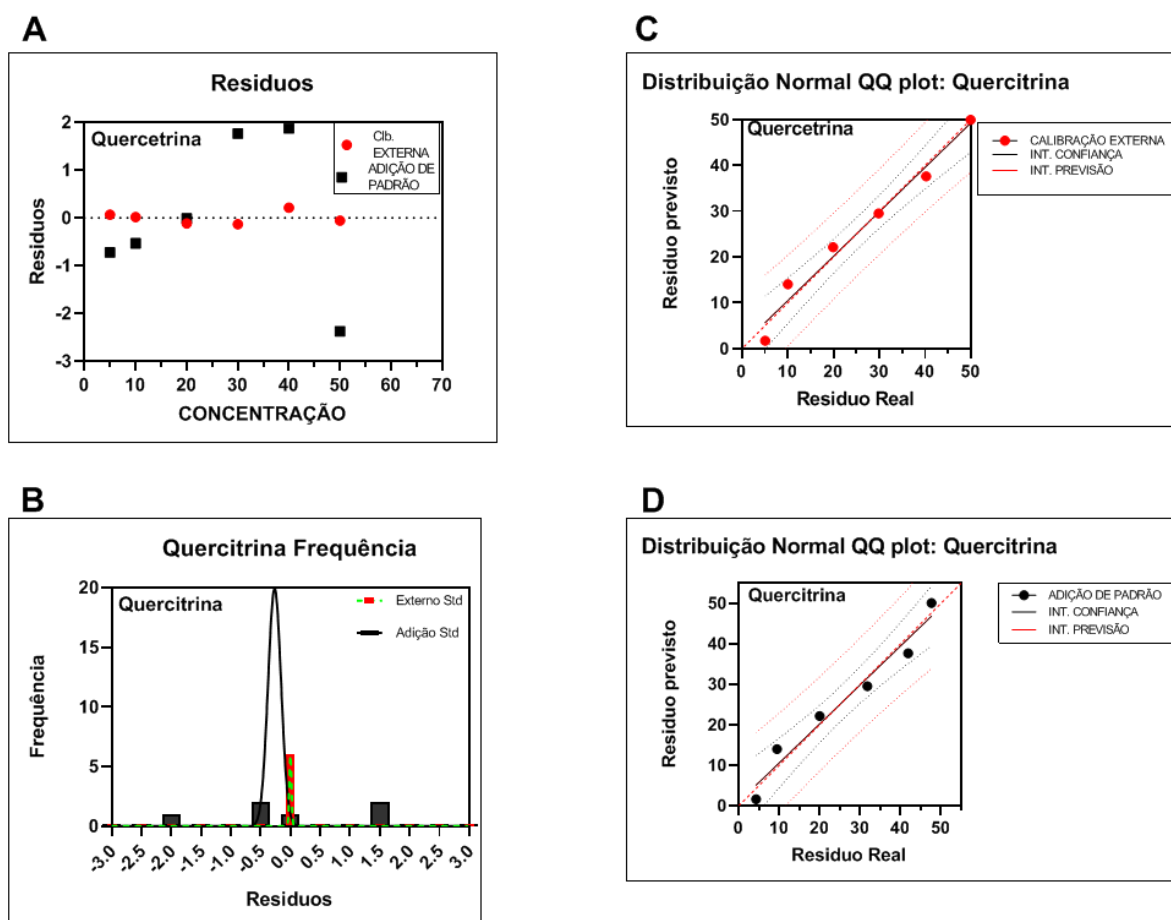


Gráfico 14. Análise de Resíduos do flavonóide Quercitrina



\* A: resíduos student gerados pela curva; B: Distribuição normal de resíduos estimados pelo resíduos real e o previsto no método da calibração externa e C: pelo método de adição do padrão; D: histograma da frequência dos resíduos.

Ao avaliar a linearidade da curva da myricitrina pelos dois métodos calibração externa e adição de padrão, ambos foram lineares (Gráfico 15), e o ajuste de modelo não teve violação aparente no pressuposto de igual variância a cada nível de X. A frequência dos resíduos não violou o pressuposto de normalidade. A Distribuição normal QQ Plot dos resíduos formou um padrão em torno da linha, o que é evidência de que a normalidade não foi violada, e os pontos estão dentro dos intervalos de confiança e de previsão. Entretanto ao analisar os dois métodos, é possível observar que há uma maior dispersão dos resultados pelo

método de adição do padrão onde na Gráfico 18 B, é possível ver que o sino é mais aberto em relação ao sino obtido pelo método da adição do padrão, com tendência central e englobando todos os pontos, enquanto que pelo método da calibração externa, sendo assim o método da adição do padrão é mais adequado para quantificar myricitrina contidas no extrato e nas formulações de *Thuya occidentalis*.

**Gráfico 15. Linearidade do flavonóide Myricitrina e suas respectivas bandas de confiança e previsão.**

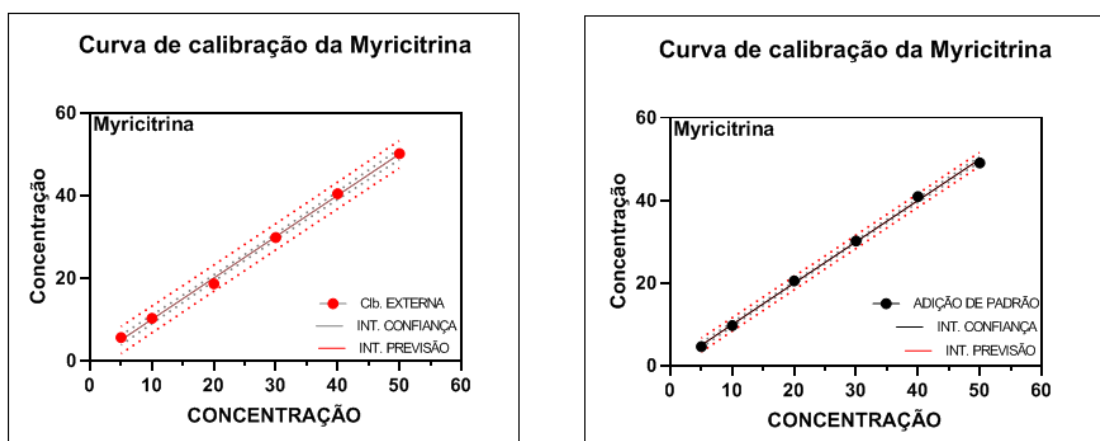
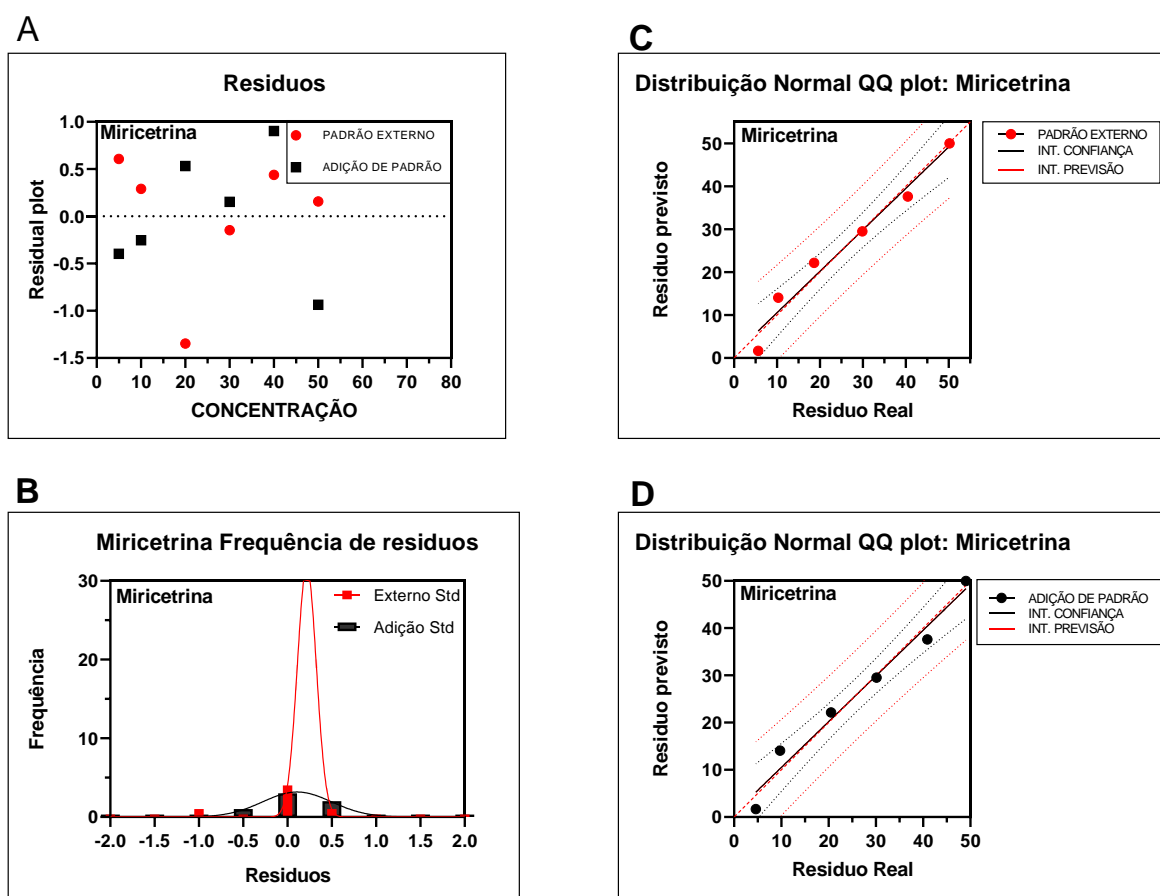


Gráfico 16. Análise de Resíduos do flavonóide Myricitrina

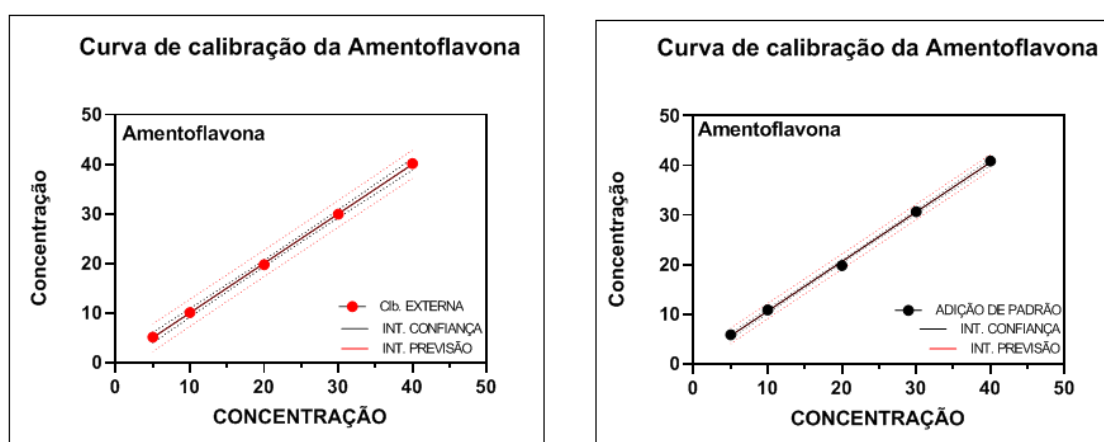


\* A: resíduos student gerados pela curva; B: Distribuição normal de resíduos estimados, pelo resíduos real e o previsto no método da calibração externa e C: pelo método de adição do padrão; D: histograma da frequência dos resíduos.

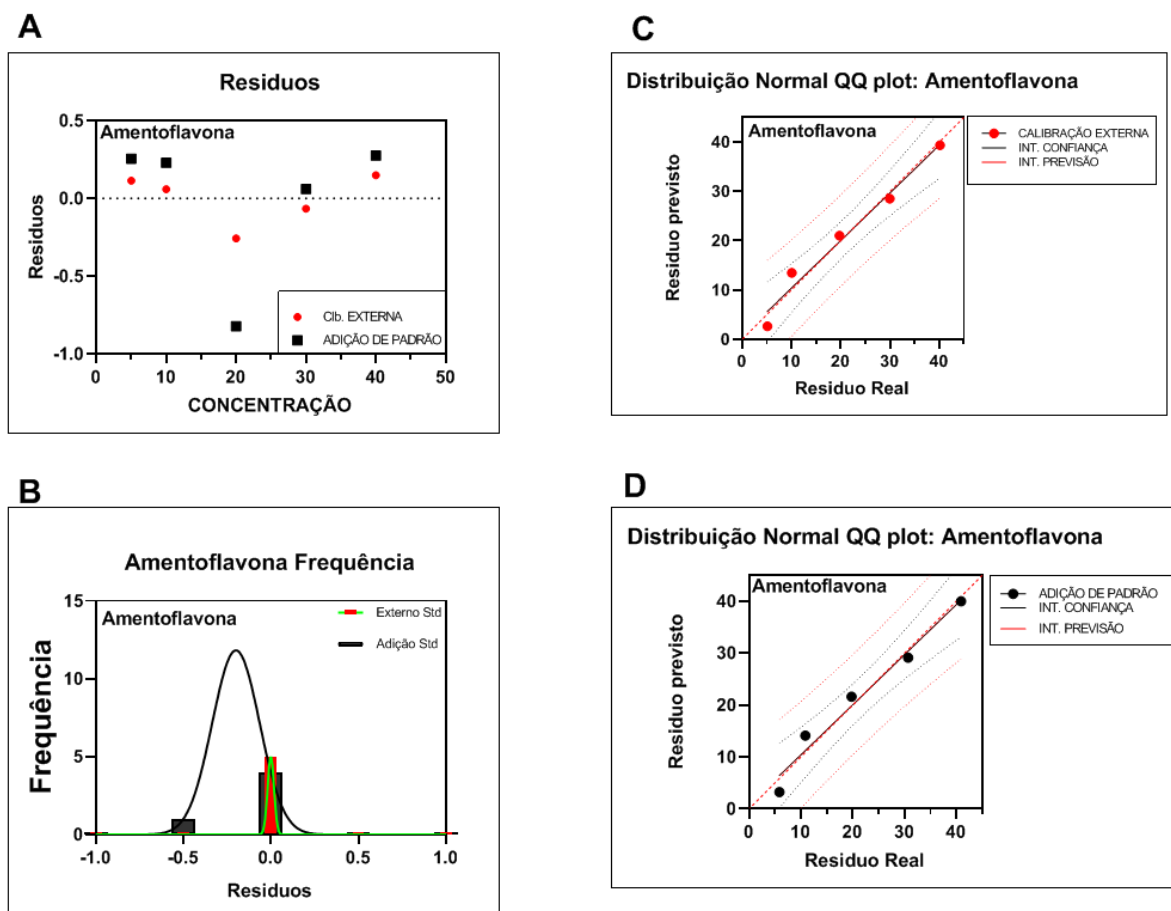
Ao avaliar a linearidade da curva da amentoflavona pelos dois métodos da calibração externa e adição de padrão, ambos foram lineares (Gráfico 17) e o ajuste de modelo não teve violação aparente no pressuposto de igual variância a cada nível de X. A frequência dos resíduos não violou o pressuposto de normalidade. A Distribuição normal QQ Plot dos resíduos formou um padrão em torno da linha, o que é evidência de que a normalidade não foi

violada, e os pontos estão dentro dos intervalos de confiança e de previsão. E os resultados (pontos) estão dentro dos intervalos de confiança e de previsão. Entretanto ao analisar os dois métodos, é possível observar que há uma maior dispersão dos resultados pelo método de adição do padrão onde na Gráfico 18 B é possível ver que o sino é mais aberto em relação ao sino obtido pelo método do calibração externa, sendo assim os resultados variam menos pelo método do calibração externa, com tendência central, podendo ser utilizada para quantificar o flavonóide por este método.

**Gráfico 17. Linearidade do flavonóide Amentoflavona e suas respectivas bandas de confiança e previsão.**



**Gráfico 18. Análise de Resíduos do flavonóide amentoflavona.**



\* A: resíduos student gerados pela curva; B: Distribuição normal de resíduos estimados, pelo resíduos real e o previsto no método da calibração externa e C: pelo método de adição do padrão; D: histograma da frequência dos resíduos.

Ao analisar os dois métodos de calibração externa e de adição padrão, os desvios padrões e coeficientes de variância não são significativamente diferentes um do outro através do Teste de T, e pela análise dos resíduos e frequência, o método de adição de padrão foi o mais adequado e ajustado, com menor variação, para os flavonóides catequina e myricitrina. Já para os flavonóides amentoflavona e quecetrina o método de calibração externa é mais adequado.

### 5.8.3. Recuperação como exatidão do método UPLC-DAD-UV

O experimento de recuperação foi realizado para avaliar a exatidão do método usando os padrões. A resposta dos três níveis (50%, 100%, 150%), em triplicata produziu uma recuperação máxima 103.37 % e mínima de 93.27% pelo método da calibração externa; e 105,85% e 93.23% pelo método de adição do padrão. As variações na Exatidão/recuperação foram calculadas a partir da resposta de cada flavonóide individual. Os resultados demonstraram que o método possui capacidade suficiente para a quantificação exata do flavonóide nos extratos e nas formulações contendo *Thuya occidentalis*. Os resultados podem ser visualizados nas Tabela 8, Tabela 9.

### 5.8.4. Precisão intra-dia e inter-dia

A precisão do método foi avaliada nos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária dos padrões. A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada usando os resultados das preparações nos três níveis exigidos em triplicata, contendo flavonóides. O CV% dos flavonóides (individuais) foi de 3.31% e a precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada pelos dados gerados em dias diferentes com um CV% de flavonóides de 8.65% pelo método de calibração externa e 8.16% e 10,30% pelo método de adição do padrão. A Anvisa (2017) considera variação de até 15% do Coeficiente de variância (CV) aceitável. Os resultados indicam que o método validado é preciso e reprodutível para ambos os métodos de quantificação para todos os flavonóides. Tabela 8, Tabela 9.



**Tabela 8. Resultados de precisão e exatidão do método UPLC-DAD pelo método da calibração externa.**

Extrato vegetal	Precisão									Exatidão				
	Intra-dia			Inter-dia			Inter-dia			R%	Bias %			
	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	R%	Bias %
Myricitrina														
LQ (10µg/mL)	10.75	±0.06	0.54	10.41	±0.04	0.42	9.71	±0.14	1.40	10.29	±0.53	5.14	102.90	+2.90
LQ (20 µg/mL)	19.53	±0.10	0.49	18.92	±0.04	0.20	17.51	±0.16	0.93	18.65	±1.03	5.54	93.27	-6.73
LQ (30 µg/mL)	31.02	±0.12	0.38	30.07	±0.17	0.56	28.47	±0.14	0.50	29.85	±1.29	4.31	99.51	-0.49
Quercitrina														
LQ (10µg/mL)	9.91	±0.00	0.01	10.38	±0.20	1.93	9.77	±0.13	1.36	10.02	±0.87	8.65	100.20	+0.20
LQ (20 µg/mL)	20.06	±0.17	0.84	20.22	±0.08	0.38	19.37	±0.09	0.47	19.89	±0.27	1.35	99.43	-0.57
LQ (30 µg/mL)	29.98	±0.10	0.33	30.34	±0.09	0.30	29.29	±0.16	0.56	29.87	±0.28	0.94	99.56	-0.44
Amentoflavona														
LQ (10µg/mL)	10.27	±0.16	1.54	10.58	±0.35	3.31	9.32	±0.25	2.64	10.06	±0.66	6.52	100.60	+0.60
LQ (20 µg/mL)	20.97	±0.49	2.36	20.20	±0.07	0.34	18.06	±0.03	0.18	19.74	±1.51	7.63	98.71	-1.29
LQ (30 µg/mL)	31.27	±0.34	1.09	30.34	±1.06	3.49	28.19	±0.06	0.21	29.93	±1.58	5.29	99.78	-0.22
Catequina														
LQ (10µg/mL)	10.12	±0.07	0.68	9.91	±0.30	3.00	9.67	±0.26	2.67	9.90	±0.23	2.30	99.00	-1.00
LQ (20 µg/mL)	20.93	±0.30	1.45	20.81	±0.07	0.32	20.29	±0.27	1.31	20.67	±0.34	1.65	103.37	+3.37
LQ (30 µg/mL)	29.64	±0.01	0.02	29.50	±0.17	0.59	28.35	±0.01	0.05	29.16	±0.71	2.42	97.21	-2.79

\*Cada valor é expresso como média; DV: Desvio padrão; CVD%: coeficiente de variação; R%: recuperação do valor teórico = (média /valor teórico) × 100.

Bias %= [(média–valor teórico)/valor teórico] × 100.

**Tabela 9. Resultados de precisão e exatidão do método UPLC-DAD pelo método de adição do padrão.**

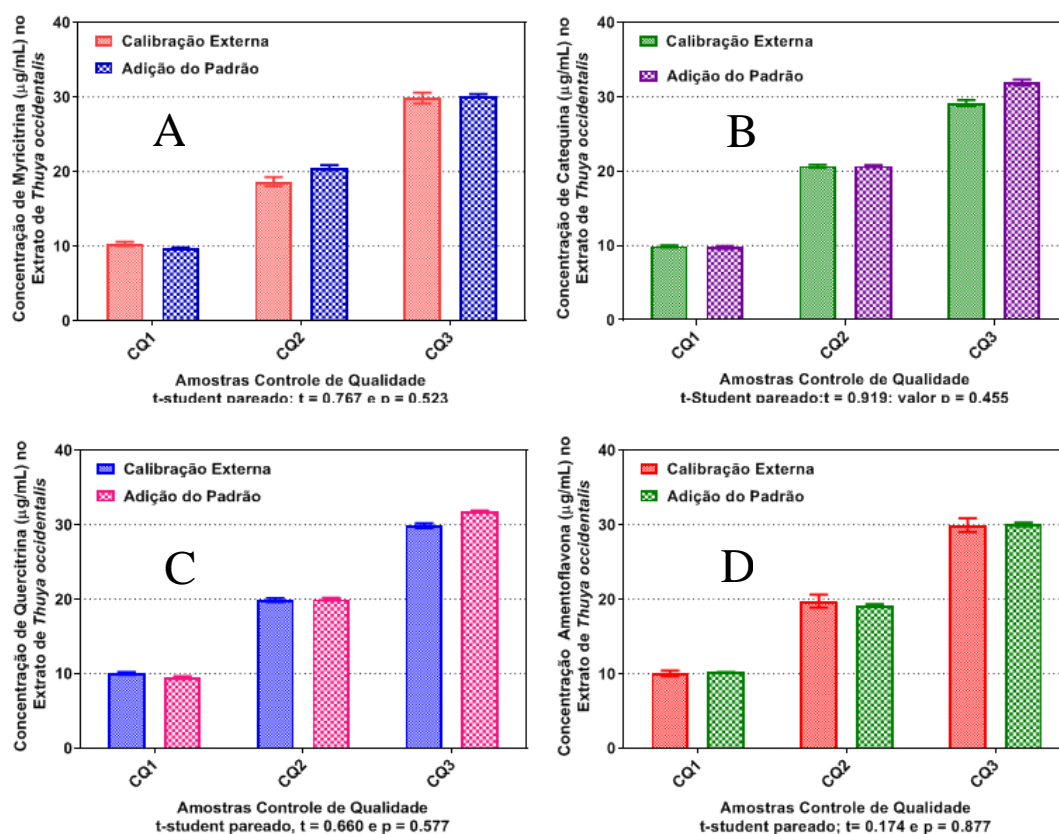
Extrato vegetal	Precisão									Exatidão				
	Intra-dia			Inter-dia			Inter-dia			R%	Bias %			
	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	Media	DP	%CV	R%	Bias %
Myricitrina														
LQ (10µg/mL)	9.93	±0.06	0.57	9.62	±0.05	0.55	9.69	±0.11	1.12	9.75	±0.16	1.63	97.46	-2.54
LQ (20 µg/mL)	20.99	±0.19	0.90	19.87	±0.30	1.53	20.73	±0.01	0.05	20.53	±0.59	2.87	102.66	+2.66
LQ (30 µg/mL)	30.56	±0.06	0.19	29.75	±0.72	2.43	30.15	±0.03	0.08	30.15	±0.40	1.34	100.51	+0.51
Quercitrina														
LQ (10µg/mL)	9.32	±0.21	2.24	9.82	±0.11	1.09	9.24	±0.30	3.22	9.46	±0.31	3.32	94.59	-5.41
LQ (20 µg/mL)	19.84	±0.16	0.80	20.33	±0.04	0.21	19.77	±0.25	1.25	19.98	±0.30	1.53	99.89	-0.11
LQ (30 µg/mL)	31.65	±0.11	0.36	32.03	±0.01	0.05	31.59	±0.05	0.15	31.76	±0.24	0.75	105.85	+5.85
Amentoflavona														
LQ (10µg/mL)	10.24	±0.12	1.14	10.26	±0.12	1.20	10.14	±0.00	0.02	10.21	±0.06	0.62	102.14	+2.14
LQ (20 µg/mL)	19.02	±0.03	0.14	19.55	±0.07	0.35	18.92	±0.14	0.74	19.16	±0.34	1.76	95.82	-4.18
LQ (30 µg/mL)	29.64	±0.86	2.91	30.53	±0.46	1.52	29.97	±0.37	1.24	30.05	±0.45	1.49	100.15	+0.15
Catequina														
LQ (10µg/mL)	8.85	±0.72	8.16	9.10	±0.01	0.13	10.02	±0.60	6.03	9.32	±0.96	10.30	93.23	-6.77
LQ (20 µg/mL)	20.28	±0.06	0.31	20.28	±1.02	5.03	20.06	±0.16	0.79	20.21	±0.65	3.21	101.05	+1.05
LQ (30 µg/mL)	30.93	±0.15	0.49	32.32	±0.18	0.54	31.16	±0.70	2.23	31.47	±1.03	3.27	104.90	+4.90

\*Cada valor é expresso como média; DV: Desvio padrão; CVD%: coeficiente de variação; R%: recuperação do valor teórico = (média /valor teórico) × 100.

Bias %= [(média–valor teórico)/valor teórico] × 100.

Ao analisar graficamente, lado a lado precisões pelos dois métodos de calibração para cada padrão de flavonóide, observa-se que não houve diferença estatística entre o método de adição de padrão e o método da calibração externa e pode ser visualizado no gráfico abaixo. Sendo assim os dois métodos podem ser utilizados para quantificar os flavonóides presentes no extrato de *Thuya occidentalis*.

**Gráfico 19. Precisão das Amostras de Controle de qualidade, pelos métodos de calibração externa e adição de padrão. (A) Myricitrin, (B) Catequina, (C) Quercetrina e (D) Amentoflavona.**



### 5.8.5. Robustez

O teste de robustez foi realizado variando-se o parâmetro operacional, como pH da fase móvel e temperatura do forno, em amostras de extratos de  $500 \mu\text{g/mL}$  de *Thuya*

*occidentalis*. A variabilidade da percentagem de áreas de pico em amostras de flavonóides está resumida na Tabela 10 e 11.

O conteúdo de flavonóides encontrado no extrato de *Thuya occidentalis* obtido a partir de condições alteradas de UPLC, ao variar a temperatura não teve mudança significativa nos flavonóides, eles não sofreram influência da temperatura pelos dois métodos. Para a condição alterada de pH UPLC, o teste apresentou valor de p significativo para myricitrina e amentoflavona, pelos dois métodos: calibração externa e adição do padrão. O que sugere a variação do pH interfere na quantidade desses flavonóides. A quercitrina mostrou valores de p não significativos. Esses baixos valores de variação percentual (absoluta) revelaram que o método proposto é robusto apenas para quercitrina, uma vez que a concentração de amentoflavona e myricitrina podem variar com a variância dos parâmetros de pH do método. O desenvolvimento do método UPLC deve ser bem ajustado na fase móvel, deve-se controlar o pH do meio para que não sofra alterações e interfira na determinação dos flavonóides myricitrina e amentoflavona. Não foi possível quantificar e avaliar a robustez do método para a catequina usando a menor concentração do extrato.

**Tabela 10. Determinação dos parâmetros de robustez durante a validação do método UPLC-DAD para os flavonóides de *Thuya occidentalis*, pelo método da calibração externa.**

Flavonóides	Robustez									Valor de p
	Temperatura (°C)									
	30			31			32			
	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	
Myricitrina	5.94	±0.04	0.75	5.95	±0.20	3.33	5.90	±0.25	4.27	0.95
Quercitrina	18.97	±0.34	1.81	19.01	±0.13	0.70	19.18	±0.23	1.21	0.86
Amentoflavona	3.76	±0.12	3.19	3.76	±0.22	5.74	3.74	±0.24	6.30	0.98
(%) Ácido acético na fase móvel										

	0.1			0.2			0.3			Valor de p
	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	
Myricitrina	5.77	±0.14	2.44	5.93	±0.07	1.16	6.08	±0.10	1.61	0.99
Quercitrina	19.12	±0.22	1.13	19.03	±0.32	1.70	19.01	±0.25	1.33	0.86
Amentoflavona	3.54	±0.09	2.47	3.89	±0.02	0.58	3.83	±0.07	1.75	0.00

\* cada valor é expresso em média dos valores medidos em triplicata; DP: desvio padrão; %CV: coeficiente de variação; valor de p por meio de teste ANOVA-one away.

**Tabela 11. Determinação dos parâmetros de robustez durante a validação do método UPLC-DAD para os flavonóides de *Thuya occidentalis*, pelo método da adição do padrão.**

Flavonóides	Robustez									Valor de p
	Temperatura (°C)									
	30			31			32			
	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	
Myricitrina	4.33	±0.05	1.06	4.34	±0.20	4.69	4.30	±0.26	6.04	0.95
Quercitrina	5.98	±0.15	2.54	5.99	±0.06	0.98	6.07	±0.10	1.69	0.58
Amentoflavona	2.82	±0.12	4.16	2.82	±0.21	7.49	2.80	±0.23	8.22	0.98
(%) Ácido acético na fase móvel										
	0.1			0.2			0.3			Valor de p
	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	Média	DP	%CV	
Myricitrina	4.16	±0.15	3.49	4.32	±0.07	1.63	4.48	±0.10	2.25	0.03
Quercitrina	6.04	±0.10	1.58	6.00	±0.14	2.38	5.99	±0.11	1.86	0.86
Amentoflavona	2.61	±0.09	3.29	2.94	±0.02	0.75	2.89	±0.07	2.26	0.00

\* cada valor é expresso em média dos valores medidos em triplicata; DP: desvio padrão; %CV: coeficiente de variação; valor de p por meio de teste ANOVA-one away

### 5.8.6. Aplicabilidade do método

O método analítico foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de flavonóides no extrato de *Thuya occidentalis*. Este método foi preciso e efetivo para avaliar a composição de *Thuya occidentalis* pela quantificação simultânea dos principais

flavonóides. O conteúdo do extrato foi semelhante ao conteúdo descrito anteriormente por Naser *et al.* (2006). O método mostrou que o extrato de *Thuja occidentalis* possui 7,21% do total de flavonóides, e individualmente possui myricitrina (1,18%), quercitrina (4,06%), amentoflavona (0,75%) e Catequina (1,22%), pelo método da calibração externa. O método mostrou que o extrato de *Thuja occidentalis* possui 4,39% do total de flavonóides, e individualmente possui myricitrina (1,09%), quercitrina (1,50%), amentoflavona (0,63%) e Catequina (1,17%), pelo método de adição do padrão. Não foi possível quantificar o flavonóide rutina. Estudos têm demonstrado que os polifenóis, como os flavonóides, possuem inúmeras atividades biológicas como anti-inflamatória, antidiabética e antioxidantes, e essas propriedades estão relacionadas às suas propriedades antioxidantes e/ou à capacidade de inibir a enzima (COMALADA *et al.*, 2005; BABUJANARTHANAM *et al.*, 2011).

O método UPLC-DAD foi usado para quantificar os flavonóides em formulações fitoterápicas contendo *Thuja occidentalis*. Os resultados podem ser vistos nas Tabela 12, 13 e Gráfico 20 e 21.

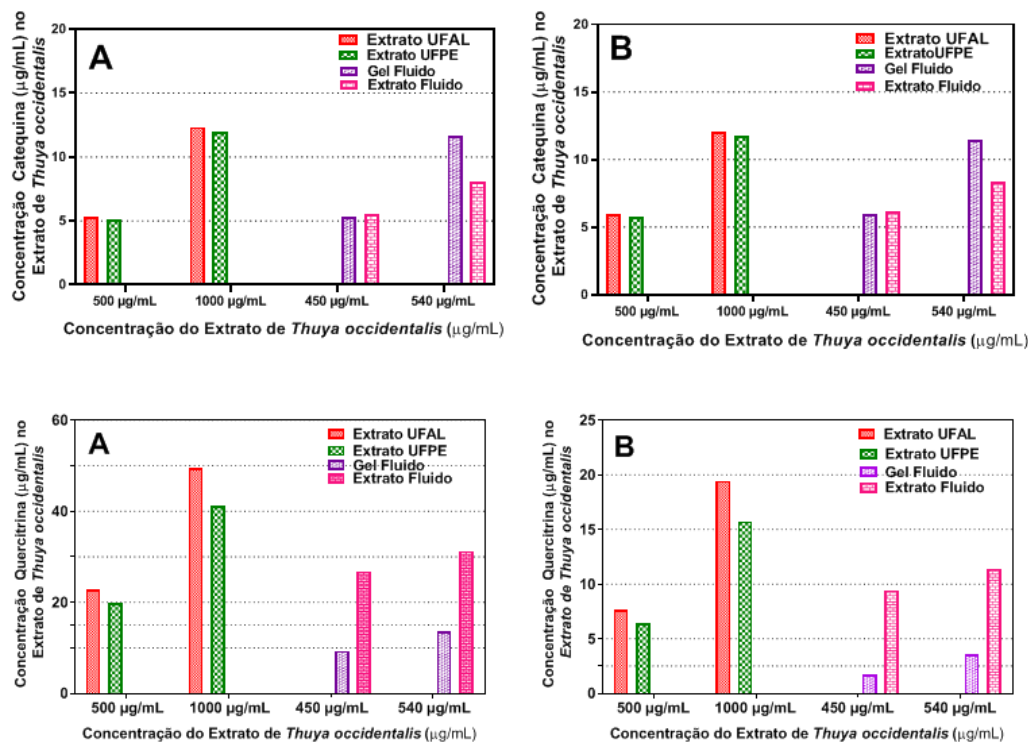
**Tabela 12. Quantificação de flavonóides pelo método da calibração externa nas formulações contendo *Thuja occidentalis***

Flavonóides	Extrato Macerado		Extrato Bruto		Gel Fluido		Extrato Fluido	
	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	450 µg/mL	540 µg/mL	450 µg/mL	540 µg/mL
<b>Catequina</b>								
Média	5.33	12.34	5.10	11.99	5.36	11.67	5.56	8.09
DP	±0.00	±0.00	±0.51	±0.45	±0.80	±0.13	±2.12	±0.30
%CV	0.00	0.00	10.04	3.74	15.00	1.13	38.14	3.76
<b>Myricitrina</b>								
Média	6.69	13.43	6.02	11.88	5.60	8.00	7.61	9.02
DP	±0.00	±0.00	±0.06	±0.05	±0.03	±0.04	±0.23	±0.13
%CV	0.00	0.00	0.97	0.43	0.61	0.45	3.01	1.42
<b>Quercitrina</b>								
Média	22.73	49.52	19.92	41.12	9.29	13.59	26.79	31.26
DP	±0.00	±0.00	±0.24	±0.12	±0.06	±0.06	±0.44	±0.55
%CV	0.00	0.00	1.19	0.30	0.65	0.47	1.64	1.75
<b>Amentoflavona</b>								
Média	3.91	5.93	4.44	7.12	2.91	3.07	4.55	4.50
DP	±0.00	±0.00	±0.14	±0.40	±0.03	±0.12	±0.31	±0.20
%CV	0.00	0.00	3.20	5.56	1.09	3.90	6.91	4.39

**Tabela 13. Quantificação de flavonóides pelo método de adição do padrão nas formulações contendo *Thuja occidentalis***

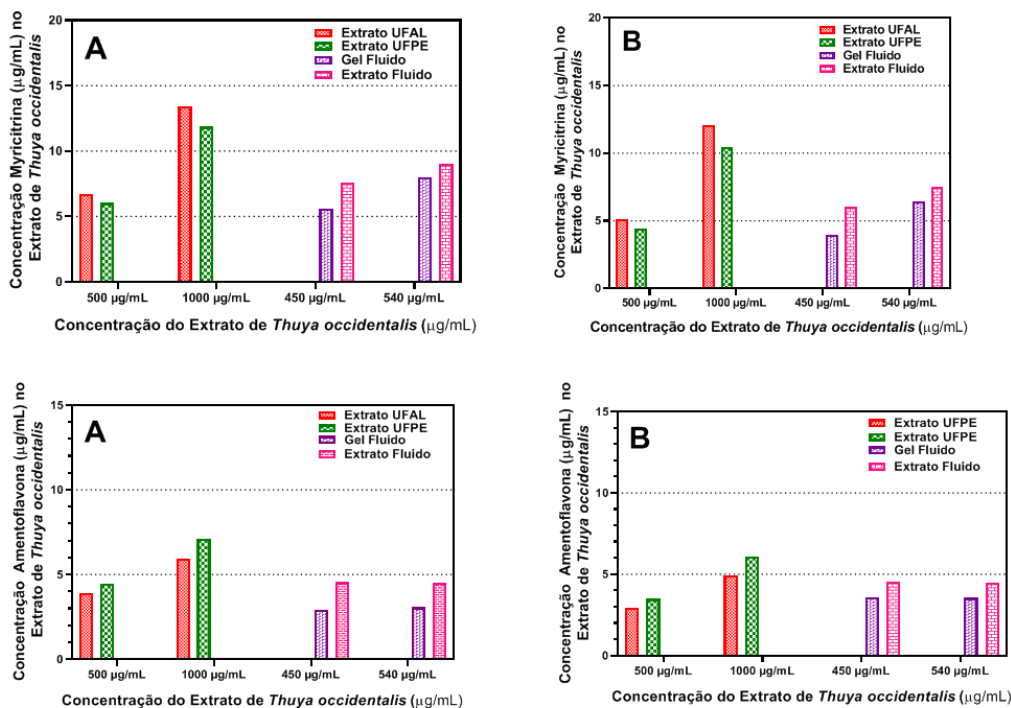
Flavonóides	Extrato Macerado		Extrato Bruto		Gel Fluido		Extrato Fluido	
	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	450 µg/mL	540 µg/mL	450 µg/mL	540 µg/mL
<b>Catequina</b>								
Média	5.92	12.03	5.72	11.73	5.95	11.45	6.12	8.32
DP	±0.00	±0.00	±0.45	±0.39	±0.70	±0.12	±1.85	±0.27
%CV	0.00	0.00	7.82	3.34	11.81	1.01	30.26	3.19
<b>Myricitrin</b>								
Média	5.11	12.05	4.41	10.45	3.98	6.46	6.05	7.51
DP	±0.00	±0.00	±0.06	±0.05	±0.03	±0.04	±0.24	±0.13
%CV	0.00	0.00	1.36	0.50	0.88	0.57	3.90	1.75
<b>Quercitrina</b>								
Média	7.63	19.46	6.40	15.75	1.70	3.60	9.43	11.40
DP	±0.00	±0.00	±0.10	±0.05	±0.03	±0.03	±0.19	±0.24
%CV	0.00	0.00	1.64	0.34	1.57	0.79	2.06	2.12
<b>Amentoflavona</b>								
Média	2.96	4.94	3.49	6.11	3.59	3.55	4.55	4.50
DP	±0.00	±0.00	±0.14	±0.39	0.31	0.19	±0.31	±0.20
%CV	0.00	0.00	3.98	6.35	8.56	5.45	6.91	4.39

**Gráfico 20. Concentração dos flavonóides catequina e quercitrina em formulações contendo *Thuja occidentalis*, pelo método da calibração externa(A) e adição do padrão (B)**





**Gráfico 21. Concentração dos flavonóides myricitrina e amentoflavona em formulações contendo *Thuja occidentalis*, pelo método da calibração externa(A) e adição do padrão (B).**



Não houve diferença significativa de quantificação dos flavonóides entre as formulações. Entretanto, a quantidade de quercitrina varia bastante ao usar ambos os métodos (calibração externa e adição do padrão) (valor de  $p = 0,01966$ ). Embora o método da calibração externa atenda todos os requisitos de linearidade, há uma exacerbação da quantificação do flavonóide, uma vez que quantifica também interferentes e outras substâncias que estão coelindo juntamente com a quercitrina, sendo assim o nosso método não é seletivo para a quercitrina, uma vez que não consegue quantificar o flavonóide mesmo na presença de interferente, mas o método ainda pode ser utilizado pra identificar a presença deste no extrato e em outras formulações contendo o fitoterápico *Thuja occidentalis*.

Com exceção da quercitrina, todos os flavonóides podem ser quantificados por ambos os métodos de calibração: calibração externa e adição de padrão. E o método UPLC-DAD desenvolvido foi seletivo, preciso, exato e linear para a determinação dos flavonóides presentes no extrato de *Thuja occidentalis*.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a presença dos seguintes compostos químicos no extrato de *Thuya occidentalis*: flavonas, flavononóis, xantonas, flavonóis, catequinas e esteróides. O Extrato teve boa atividade antioxidante, antimicrobiana e não foi citotóxico.

Ambos os métodos de curva de calibração (calibração externa e adição de padrão) atenderam as especificações de validação para todos os flavonóides, com exceção da quercitrina.

A planta possui em sua composição compostos fenólicos em maior quantidade que flavonóides. O método UPLC-DAD foi mais efetivo em quantificar os flavonóides que o método colorimétrico tradicional usando cloreto de alumínio. O método UPLC-DAD teve boa resolução cromatográfica, com boa separação dos flavonóides: myricitrina, quercitrina, amentoflavona, rutina e catequina, o que indica que o UPLC-DAD é mais preciso e confiável para a quantificação de flavonóides em produtos fitoterápicos. Não foi possível quantificar a rutina. O método não foi seletivo para a quercitrina.

O método UPLC-DAD foi validado e provou ser linear, sensível, preciso e exato para a análise do extrato de *Thuya occidentalis* e flavonóides relacionados. Este método pode ser aplicado no controle de qualidade de *Thuya occidentalis* e formulações farmacêuticas contendo Thuja com princípio ativo, utilizando os flavonóides como marcadores fitoquímicos, uma vez que pode ser o responsável pelas propriedades terapêuticas desta planta.

## 7. REFERÊNCIAS

AHANGARPOUR, A. *et al.* Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12 cell. **Cell Stress and Chaperones**, p. 1–9, 2018.

AHMAD *et al.* Novel investigations on *Thuja occidentalis* extract on rabbit hematological and biochemical parameters. **International Research Journal of Pharmacy**, Paquistão, v. 4, n. 3, p. 135-140, 2013.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes : an alternative to [ <sup>3</sup>H ] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AKKOL *et al.* *Thuja occidentalis* L. and its active compound-thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. **Journal of Ethnopharmacology**, Turkey, v. 168, p. 25-30, 2015.

ALMEIDA, E. T. Cruz. **Caracterização físico-química e microbiológica de tintura e extratos secos de própolis vermelha de Alagoas**. 2013.143 f. Dissertação (Mestrado em nutrição), Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

ALVES *et al.* *Thuja occidentalis* L. (cupressaceae): Review of botanical, phyto-chemical, pharmacological and toxicological aspects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Recife, v. 5, n. 4, p. 1163-1177, 2014.

ARANHA, E. S. P. **Avaliação do Potencial anticâncer *in vitro* de óleos essenciais de plantas do gênero Eugenia**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas), Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014. Disponível em: <<https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4506/2/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Ellen%20Suzany%20Pereira%20Aranha.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. I. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 1009-1014, 2012.

AZIZ *et al.* Evaluation of antipyretic activity of *Thuja occidentalis* Linn. in PGE1 and TAB-vaccine induced pyrexia models in rabbits. **International Journal of Pharma Sciences**, Pakistan, v. 4, n. 2, p. 481-484, 2014.

AZIZ *et al.* Pharmacological evaluation of sedative activity of methanolic extract of *Thuja occidentalis* in mice. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, Pakistan, v. 2, n. 1, p. 202-210, 2014.

BABUJANARTHANAM, R. *et al.* Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: Induced diabetic rat tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 121–129, 2011.

BAUER, *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-96, 1966.

BEHLING *et al.* Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais e ação biológica. **Alimentos e Nutrição-Brazilian Journal of Food and Nutrition**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O Método das Adições Padrão Aplicado à Análise Cromatográfica Quantitativa de Fenóis em Águas Residuais. **Quim. Nova**, v. 11, n. 3, p. 288-291, 1988.

BOMFIM, I. S. **Induction of g2/M arrest by Fr42 isolated from *Mitracarpus Baturitensis* sucre(rubiaceae) in SF-295 cells.** 2014. 46 slides. Disponível em: <<http://ribecancer.com.br/sipm2014/apresentacao-oral/003.pptx>>. Acesso em: 4 mar. 2019.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Brazilian homeopathic pharmacopeia.** 3ed. São Paulo: Anvisa 2011. 300p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259147/Farmacopeia+HOMEOPATICA+3a+EDICAO+INGLES+com+alerta.pdf/49a48a50-0d3e-4ab9-bc41-eb361c8afbb1>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira.** 5ed. Brasília: Anvisa, 2010. 545p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o++Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.** Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira. Primeiro Suplemento.** São Paulo: Anvisa 2018. 160p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Suplemento+FFFB.pdf/478d1f83-7a0d-48aa-9815-37dbc6b29f9a>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.** Brasília: Anvisa. [200-]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa Publicações Eletrônicas, 2017. 22p. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2018.

BRASIL. MS Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. Disponível em:<[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2018.

BRENDOLAN, G. **Validação de métodos analíticos cromatográficos.** Pedreira: expolabor e isolabro consultoria e treinamento, 2000. 72p. [apostila]

BRITO, E. S. *et al.* **Comunicado Técnico. Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).** p. 3–6, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11964/1/cot-125.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2018.

BURNS, R. N.; HONKALA, B. H. ***Thuja occidentalis* L.: Northern White-Cedar.** Dez. 1990. Disponível em: <[http://www.na.fs.fed.us/Spfo/pubs/silvics\\_manual/Volume\\_1/thuja/occidentalis.htm](http://www.na.fs.fed.us/Spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/thuja/occidentalis.htm)>. Acesso em: 19 Set. 2016.

CABARITI, E. **Distribuição normal.** ETEC FATEC, 2013. 18p. [apostila]. Disponível em: <<https://www.ime.usp.br/~salles/fatec/estatistica/aula8.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2019

CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Legislação e controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos nos países do Mercosul. **Infarma, ciências farmacêuticas**, p. 123–139, 2016.

CHASIN *et al.* Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 11, n. 1, p.1-6, 1998.

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

CHUNG, J. E. *et al.* Amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 1, p. 113–118, 2004.

CHUNMEI, D. *et al.* Investigation of anti-microbial activity of catechin on *Escherichia coli* growth by microcalorimetry. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 284–288, 2010.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard.** NCCLS document M7-A7. 2006. 64p.

COMALADA, M. *et al.* *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 2, p. 584–592, 2005.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista virtual de química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DHIMAN *et al.* An appraisal on pharmacognosy, phytochemistry and bioactivity of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae). **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, v. 1, n. 3, p. 1-5, 2012.

DOMITROVIĆ, R. *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 230, p. 21–29, 2015.

DORNAS *et al.* Flavonóides : Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Minas Gerais, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Antioxidant activities of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, India, v. 2, n. 1, p. 73-76, 2009.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Role of phenolics in anti-atherosclerotic property of *Thuja occidentalis* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, India, v. 13, n. 1, p. 791–800, 2009.

EKSBORG, S.; EHRSSON, H. Calibration curves? Calculation and evaluation of accuracy. **Therapeutic drug monitoring**, v. 16, p. 629-30, 1994.

ENDERLE, D. C. *et al.* Controle de qualidade do fitoterápico *Passiflora incarnata* L. **Facider revista científica**, Colider, p. 1–11, 2018.

FERNANDES, A. J. D. *et al.* Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, Botucatu v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SOUZA, N. S. Flavonas e flavonóis : novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista agroambiente online**, Boa Vista, v. 2, n. 2, p. 57-60, 2008.

FIGUEIRÊDO, C. B. M. *et al.* Doseamento de flavonóides totais das partes aéreas de *Thuja occidentalis* linn. (Cupressaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 4, p. 509–516, 2015.

FILHO, H. S. **Distribuição normal**. UNIFAP, 2014. [apostila]. Disponível em: <<http://www2.unifap.br/herondino/files/2014/04/7-DISTRIBUI%C3%87%C3%83O-NORMAL.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

FIRUZI, O. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 174–184, 2005.

FRANCHI, L. P.; TAKAHASHI, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Quim. Nova** v. 35, n. 3, p. 571–580, 2012. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No3\\_571\\_24-RV11338](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No3_571_24-RV11338)>. Acesso em: 31 mar. 2019.

GIBSON *et al.* Rapid Quantification of Mitogen-induced Blastogenesis in T Lymphocytes for Identifying Immunomodulatory Drugs. **J. Vis. Exp.** v. 118, 2016 Disponível em: <<https://www.jove.com/video/55212/quantificacao-rpida-de-blastognese-induzida-por-mitogenio-em-linfocitos-t?language=Portuguese>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

GRAPHPAD Software, inc. QQ-plot. La Jolla, California, USA.[200-] Disponível em: <[https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/stat\\_qq-plot](https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/stat_qq-plot)>. Acesso em: 31 mar. 2019.

GULLÓN, B. *et al.* Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 220–235, 2017.

HALLIWELL, B.; WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**, v. 313, p.17–29, 1996.

HAWKINS, D. M. **Identification of outliers**. New York: Chapman and hall, 1980.

HEGENBERG, L. **Doença: um estudo filosófico** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1998. 137. Disponível em SciELOBooks: <<http://books.scielo.org/id/pdj2h/pdf/hegenberg-9788575412589-09.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

HENDERSON, A. R. Chemistry with confidence: should clinical chemistry require confidence intervals for analytical and other data. **Clin. Chem.**, v.39, p. 923-35, 1193.

HEYDEN, Y. V.; **Analysis**, v.22, 1994.

HOSSAIN *et al.* Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. **Asian Pac. J. Trop. Biomed**, v. 3, n. 9, p. 705-710, 2013.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 391–400, 2007.

HUANG, C. F. *et al.* Extract of lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and its active constituent catechin with insulin secretagogue activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1087–1094, 2011.

HUANG, Q. *et al.* Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 550–560, 2014.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC Int.**, v. 11, n. 96.1998.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. São Paulo: INMETRO, 2011. 35p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2018.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia**, 2 ed. São Paulo, INMETRO. 2000.

International Conference on Harmonisation (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005. 17p. Disponível em: <[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2018.

International Standard Organization(ISO). **Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 1: Probability and General Statistical Terms**. 2d. ISO. 2006. 105p.

JASUJA *et al.* Essential oil and important activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, India, v. 18, n. 4, p. 931-949, 2015.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameter. **Instrument. Sci. Technol.**, v. 26, 1998.

JOSEPH, *et al.* Successful treatment of verruca vulgaris with *Thuja occidentalis* in a renal allograft recipient. **Indian Journal of Nephrology**, v. 23, n. 5, p. 362–364, 2013.

JUNG, Y. J. *et al.* AKR1B10-inhibitory Selaginella tamariscina extract and amentoflavone decrease the growth of A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, p. 78–84, 2017.

KASSEM, M. E. S. *et al.* Myricitrin and bioactive extract of Albizia amara leaves: DNA protection and modulation of fertility and antioxidant-related genes expression. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2404–2409, 2016.

KHAN, M. M. *et al.* Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 22, p. 1-5, 2012.

KHROMYKH, L. M.; ANFALOVA, T. V; KAZANSKII, D. B. Colorimetric *In Vitro* Evaluation of T-Cell Cytotoxicity. **Bull Exp Biol Med**. v. 136, n. 3, p. 314–317, 2003.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Validation viewpoint: quantification in method validation. **LC-GC**, v. 16, n. 12, p. 1084-1090, 1998.



LEE, J. S. *et al.* Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1427–32, 2009.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: átomo, 1998. 224p.

LEVINE, D. M; BERENSON, M. L; STEPHAN, D. **Estatística: Teoria e aplicações. Usando Microsoft excel em português**. Rio de Janeiro: LTC- livros técnicos e científicos editora S.A., 2000. Cap. 11.

LI, X. *et al.* Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6"-OH group. **Molecules**, v. 21, n. 9, 2016.

LOKESH *et al.* Neuropharmacological exploration of *Thuja occidentalis*. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 2, n. 23, p. 143-148, 2011.

LU, J. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 76–83, 2013.

MACLAUGHLIN *et al.* Effects of homeopathic preparations on human prostate cancer growth in cellular and animal models. **Integrative cancer therapies**, v. 5, n. 4, p. 362-372, 2006.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce Online**, n. 46, 1998. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>>. Acesso em: 13 Set. 2016.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Ed UFC, 1997.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e controle de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006, 139p. Tese (Mestre em ciências dos alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATUDA, N. S. **Aula análise de resíduos**. 2017. 26 Slides. Disponível em: <<https://docs.ufpr.br/~niveam/ce071/aula7.pdf>>. Acesso em 31 mar. 2019.

MEENU *et al.* Physico-chemical and preliminary phytochemical investigation of *Thuja occidentalis* Linn. (cupressaceae) dried leaves. **International Research Journal of Pharmacy**, India, v. 2, n. 23, p. 213-217, 2011.

MENDONÇA *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Alagoas, v. 15, n. 357, p. 1-12, 2015.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol. Res.**, v. 152, p. 239-246, 1997.

NA, M. *et al.* Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of amentoflavone and its cellular effect on tyrosine phosphorylation of insulin receptors. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 2, p. 379–81, 2007.

NASER *et al.* *Thuja occidentalis* (arbor vitae): a review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Germany, v. 2, n. 1, p. 69-78, 2005.

OJESWI *et al.* Protective effect of *Thuja occidentalis* against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. **Human & Experimental Toxicology**, India, v. 29, n. 5, p. 369-375, 2010.

OLIVEIRA *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím. Nova**, São Paulo, v.32 n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J. M. S. **Caracterização da composição fitoquímica da própolis vermelha de Alagoas**. 2013. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

OMS. **Non communicable diseases**. Jan. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>>. Acesso em: 8 Set. 2016.

OMS. **Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. World Health Organization (WHO), p. 1–76, 2013. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090\\_eng.pdf;jsessionid=6470E9DBE23578064044C2B7D83C5B32?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090_eng.pdf;jsessionid=6470E9DBE23578064044C2B7D83C5B32?sequence=1)>. Acesso em: 4 out. 2018.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PETRY, R.D.; ORTEGA, G.G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminum chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, v.6, n. 56, p. 465-470, 2001.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

QIN, L. *et al.* Amentoflavone improves cardiovascular dysfunction and metabolic abnormalities in high fructose and fat diet-fed rats. **Food & Function**, v. 9, p. 243–252, 2018.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova.**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SAMPAIO *et al.* Estudo fitoquímico do extrato metanolico de *Thuya occidentalis*. In: **Encontro de Profissionais da Química da Amazônia**, 14, 2015, Belém.

SANTANA, H. S. **Como fazer uma análise de regressão simples no R**. 2014. Disponível em: <<https://posgraduando.com/como-fazer-uma-analise-de-regressao-linear-simples-no-r/>>. Acesso em: 31 mar. 2019

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed., New York: Wiley, 1997. cap. 15.

SOUZA, A. M. **Verificação da adequação do modelo de análise de variância – análise de resíduos**. [200-}. 27 slides. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/adriano/aulas/anova/anovacap7.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

SOUZA, F. S.; MACIEL, C.C.S. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. **Revista Eletrônica De Ciências**, v. 3, n. 2, p. 10, 2010.

STEPANOVIC ,S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC, V.M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microb. Res.**, v. 158, p. 353-57, 2003

SURESH, J.; GOWDA, Y. H. S. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Thuja occidentalis* leaves. **Advance Pharmaceutical Journal**, India, v. 1, n. 1, p. 26-30, 2016.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.**, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

THOMPSON, *et al.* Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, n. 2, p.337-348, 1999.

TORRES *et al.* Pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of the  $\alpha/\beta$ -thujone fraction from *Thuja occidentalis* on glioblastoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**, New York, v. 128 p. 9-19, 2016.

TSIRI, D. *et al.* Chemosystematic Value of the Essential Oil Composition of Thuja species Cultivated in Poland-Antimicrobial Activity. **J. Molecules**, v. 14, p. 4707-4715, 2009.

United States Pharmacopeia Convention (USP). **Validation of Compendial Methods**, US Pharmacopeia. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, 1999.

URREA-VICTORIA, V. *et al.* Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro FRAP ) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, p. 1–6, 2016.

UTTARA *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, Milan, v. 7, p. 65-74, 2009.

VANACLOCHA, B. **Fitoterápia: vademecum de prescripción**. 4d. 2003. Espanha: Elsevier masson.

VENNAT *et al.* *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharm. Acta Helv.**, v. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.

VESSMAN, *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 8, 2001.

VIAL, J; JARDY, A. experimental comparison of the diferente approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC methods. **Anal. Chem.**, v.71, p. 2672-2677, 1999.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity of roasted and instant coffees: Standardization and validation of methodologies. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 68–75, 2012.

WIEGAND, H. *et al.* Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-s transferase (GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 5, p. 717–722, 2009.

YANG *et al.* UPLC-MS-ELSD-PDA as a powerful dereplication tool to facilitate compound identification from small-molecule natural product libraries. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 902-909, 2014.

YOU, J.; LUO, Y.; WU, J. Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2581–2587, 2014.

ZAMBUZI, F. A. **Efeito de baixas concentrações de agentes antineoplásicos sobre linfócitos humanos de sangue periférico**. 2012. 36f. Dissertação (bacharel em ciência Biomédicas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho, Butucatu, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/121801/000775263.pdf?sequence=1>> . Acesso em: 31 mar. 2019.

ZHANG, B. *et al.* Myricitrin alleviates oxidative stress-induced inflammation and apoptosis and protects mice against diabetic cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–16, 2017.

ZHANG, B. *et al.* Myricitrin attenuates high glucose-induced apoptosis through activating Akt-Nrf2 signaling in H9c2 cardiomyocytes. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1–13, 2016.

ZHAO, Y. *et al.* Synergistic effects of caffeine and catechins on lipid metabolism in chronically fed mice via the AMP-activated protein kinase signaling pathway. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 2309–2318, 2016.

## 8. APENDICE

Tabela 14. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 1) pelo método da adição do padrão.

Dia 1	Catequina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV
5 µg/mL	3623	3840	3731.5	153.4421715	4.112077489
10 µg/mL	8278	9278	8778	707.1067812	8.055442939
20 µg/mL	18573	18767	18670	137.1787156	0.73475477
30 µg/mL	27921	27853	27887	48.08326112	0.172421778
40 µg/mL	36620	36132	36376	345.0681092	0.948614771
50 µg/mL	41796	41625	41710.5	120.9152596	0.289891657
Dia 1	Catequina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV
5 µg/mL	2101	2202	2151.5	71.4177849	3.319441548
10 µg/mL	6756	7640	7198	625.0823946	8.684112178
20 µg/mL	17051	17129	17090	55.15432893	0.322728665
30 µg/mL	26399	26215	26307	130.1076477	0.494574249
40 µg/mL	35098	34494	34796	427.0924958	1.227418369
50 µg/mL	40274	39987	40130.5	202.9396462	0.505699272
Dia 1	Catequina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV
5 µg/mL	2.965	3.081	3.023	0.082	2.729
10 µg/mL	8.342	9.363	8.852	0.722	8.156
20 µg/mL	20.233	20.324	20.279	0.064	0.314
30 µg/mL	31.031	30.819	30.925	0.150	0.486
40 µg/mL	41.079	40.382	40.731	0.493	1.211
50 µg/mL	47.058	46.727	46.892	0.234	0.500
Dia 1	Catequina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média		
5 µg/mL	-40.704	-38.370	-39.537		
10 µg/mL	-16.582	-6.371	-11.477		
20 µg/mL	1.167	1.618	1.393		
30 µg/mL	3.438	2.729	3.083		
40 µg/mL	2.699	0.954	1.827		
50 µg/mL	-5.884	-6.547	-6.215		
Dia 1	Extrato(branco)				
Concentração	Área	Área			
200 µg/mL	1522	1638			

**Tabela 15. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 2) pelo método da adição do padrão.**

<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	3646	3870	3758	158.3919	4.214793
10 µg/mL	8485	8440	8462.5	31.81981	0.37601
20 µg/mL	17549	18740	18144.5	842.1642	4.64143
30 µg/mL	28704	28430	28567	193.7473	0.678221
40 µg/mL	36079	35559	35819	367.6955	1.026538
50 µg/mL	43006	42261	42633.5	526.7946	1.235635
<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	2567	2850	2708.5	200.1112	7.388267
10 µg/mL	7406	7420	7413	9.899495	0.133542
20 µg/mL	16470	17720	17095	883.8835	5.170421
30 µg/mL	27625	27410	27517.5	152.028	0.552477
40 µg/mL	35000	34539	34769.5	325.9762	0.937535
50 µg/mL	41927	41241	41584	485.0753	1.166495
<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	3.891675	4.218567	4.055121	0.231147	5.700135
10 µg/mL	9.481178	9.497349	9.489263	0.011435	0.120503
20 µg/mL	19.95095	21.39482	20.67289	1.020969	4.938686
30 µg/mL	32.83603	32.58769	32.71186	0.175607	0.536829
40 µg/mL	41.35486	40.82236	41.08861	0.376533	0.916394
50 µg/mL	49.3562	48.5638	48.96	0.560308	1.14442
<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-22.1665	-15.6287	-18.8976		
10 µg/mL	-5.18822	-5.02651	-5.10737		
20 µg/mL	-0.24523	6.974114	3.364444		
30 µg/mL	9.453448	8.62563	9.039539		
40 µg/mL	3.387141	2.055895	2.721518		
50 µg/mL	-1.28761	-2.8724	-2.08		
<b>Dia 2</b>	<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>			
200 µg/mL	1079	1020			

**Tabela 16. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 3) pelo método da adição do padrão.**

Dia 3		Catequina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	3755	3840	3797.5	60.10408	1.582727	
10 µg/mL	8276	10340	9308	1459.468	15.67972	
20 µg/mL	18573	18767	18670	137.1787	0.734755	
30 µg/mL	28704	27853	28278.5	601.7479	2.127934	
40 µg/mL	36620	36132	36376	345.0681	0.948615	
50 µg/mL	41796	41625	41710.5	120.9153	0.289892	
Dia 3		Catequina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	1990	2075	2032.5	60.10408	2.95715	
10 µg/mL	6511	8575	7543	1459.468	19.34865	
20 µg/mL	16808	17002	16905	137.1787	0.811468	
30 µg/mL	26939	26088	26513.5	601.7479	2.26959	
40 µg/mL	34855	34367	34611	345.0681	0.99699	
50 µg/mL	40031	39860	39945.5	120.9153	0.302701	
Dia 3		Catequina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	3.225186	3.323369	3.274277	0.069426	2.120342	
10 µg/mL	8.447368	10.83148	9.639426	1.685824	17.48884	
20 µg/mL	20.34138	20.56546	20.45342	0.158454	0.774708	
30 µg/mL	32.04364	31.06065	31.55215	0.695076	2.202943	
40 µg/mL	41.18737	40.62368	40.90552	0.398586	0.974407	
50 µg/mL	47.16614	46.96862	47.06738	0.139669	0.296742	
Dia 3		Catequina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-35.4963	-33.5326	-34.5145			
10 µg/mL	-15.5263	8.314833	-3.60574			
20 µg/mL	1.706883	2.827325	2.267104			
30 µg/mL	6.812132	3.535513	5.173822			
40 µg/mL	2.96842	1.559204	2.263812			
50 µg/mL	-5.66773	-6.06277	-5.86525			
Dia 3		Extrato(branco)				
Concentração	Área	Área				
200 µg/mL	1765	1765				



**Tabela 17. Precisão e Exatidão inter-dia da catequina pelo método da adição do padrão.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	3.63593	3.66654	3.71216	3.67154	0.03836	1.04490
10 µg/mL	9.46511	9.10068	10.07731	9.54770	0.49353	5.16906
20 µg/mL	20.89131	20.28430	20.89131	20.68897	0.35045	1.69391
30 µg/mL	31.53781	32.32328	31.99003	31.95037	0.39423	1.23389
40 µg/mL	41.34341	40.70002	41.34341	41.12895	0.37146	0.90316
50 µg/mL	47.50526	48.57141	47.50526	47.86065	0.61554	1.28612
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-27.281	-26.669	-25.757	-26.569		
10 µg/mL	-5.349	-8.993	0.773	-4.523		
20 µg/mL	4.457	1.422	4.457	3.445		
30 µg/mL	5.126	7.744	6.633	6.501		
40 µg/mL	3.359	1.750	3.359	2.822		
50 µg/mL	-4.989	-2.857	-4.989	-4.279		

**Tabela 18. Precisão e Exatidão inter-dia da catequina pelo método da calibração externa.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	4.373104	4.463101	4.300974	4.37906	0.081227	1.854907
10 µg/mL	10.12498	9.906602	9.669697	9.900425	0.227703	2.299927
20 µg/mL	20.93124	20.80618	20.28671	20.67471	0.341789	1.653175
30 µg/mL	29.63912	29.49817	28.35137	29.16289	0.70632	2.421982
40 µg/mL	43.45831	42.57621	42.49415	42.84289	0.534547	1.247692
50 µg/mL	48.89718	47.89795	47.32554	48.04022	0.795421	1.65574
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-12.5379	-10.738	-13.9805	-12.4188		
10 µg/mL	1.249768	-0.93398	-3.30303	-0.99575		
20 µg/mL	4.656224	4.030877	1.433535	3.373545		
30 µg/mL	-1.20292	-1.67275	-5.49543	-2.79037		
40 µg/mL	8.645775	6.440516	6.235375	7.107222		
50 µg/mL	-2.20564	-4.20411	-5.34892	-3.91956		

**Tabela 19. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 1) pelo método da calibração padrão**

<b>Dia 1</b>	<b>Catequina</b>		<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	3602	3590	3596	8.485281	0.235964
10 µg/mL	7905	7979	7942	52.3259	0.65885
20 µg/mL	16269	15945	16107	229.1026	1.422379
30 µg/mL	22690	22683	22686.5	4.949747	0.021818
40 µg/mL	33277	32979	33128	210.7178	0.636072
50 µg/mL	37499	36976	37237.5	369.8168	0.99313
<b>Dia 1</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.381045	4.365163	4.373104	0.01123	0.256801
10 µg/mL	10.07601	10.17395	10.12498	0.069253	0.683978
20 µg/mL	21.14565	20.71684	20.93124	0.303214	1.44862
30 µg/mL	29.64376	29.63449	29.63912	0.006551	0.022102
40 µg/mL	43.65551	43.26111	43.45831	0.278882	0.641724
50 µg/mL	49.24327	48.55109	48.89718	0.489448	1.000973
<b>Dia 1</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-12.3791	-12.6967	-12.5379		
10 µg/mL	0.760078	1.739458	1.249768		
20 µg/mL	5.728248	3.5842	4.656224		
30 µg/mL	-1.18748	-1.21836	-1.20292		
40 µg/mL	9.138774	8.152777	8.645775		
50 µg/mL	-1.51346	-2.89783	-2.20564		

**Tabela 20. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 2) pelo método da calibração externa**

<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	3566	3762	3664	138.5929	3.782558
10 µg/mL	7936	7618	7777	224.86	2.891346
20 µg/mL	16048	15977	16012.5	50.20458	0.313534
30 µg/mL	22673	22487	22580	131.5219	0.582471
40 µg/mL	32465	32458	32461.5	4.949747	0.015248
50 µg/mL	36251	36714	36482.5	327.3904	0.89739
<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.3334	4.592803	4.463101	0.183426	4.10983
10 µg/mL	10.11704	9.696167	9.906602	0.297599	3.004049
20 µg/mL	20.85316	20.75919	20.80618	0.066445	0.319353

30 µg/mL	29.62126	29.37509	29.49817	0.174067	0.590096
40 µg/mL	42.58084	42.57157	42.57621	0.006551	0.015386
50 µg/mL	47.59156	48.20433	47.89795	0.433297	0.904625
<b>Dia 2</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-13.332	-8.14394	-10.738		
10 µg/mL	1.170359	-3.03833	-0.93398		
20 µg/mL	4.265796	3.795958	4.030877		
30 µg/mL	-1.26247	-2.08304	-1.67275		
40 µg/mL	6.452096	6.428935	6.440516		
50 µg/mL	-4.81688	-3.59133	-4.20411		

Tabela 21. Precisão e Exatidão intra-dia da catequina (Dia 3) pelo método da calibração externa.

<b>Dia 3</b>	<b>Catequina</b>		<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	3568	3515	3541.5	37.47666	1.058214
10 µg/mL	7736	7460	7598	195.1615	2.56859
20 µg/mL	15478	15762	15620	200.8183	1.285649
30 µg/mL	21706	21721	21713.5	10.6066	0.048848
40 µg/mL	32493	32306	32399.5	132.229	0.40812
50 µg/mL	36176	35924	36050	178.1909	0.494288
<b>Dia 3</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.336046	4.265902	4.300974	0.0496	1.153224
10 µg/mL	9.852339	9.487056	9.669697	0.258294	2.671165
20 µg/mL	20.09877	20.47464	20.28671	0.26578	1.310121
30 µg/mL	28.34145	28.3613	28.35137	0.014038	0.049513
40 µg/mL	42.6179	42.3704	42.49415	0.175003	0.411829
50 µg/mL	47.4923	47.15878	47.32554	0.235833	0.498321
<b>Dia 3</b>	<b>Catequina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-13.2791	-14.682	-13.9805		
10 µg/mL	-1.47661	-5.12944	-3.30303		
20 µg/mL	0.493859	2.37321	1.433535		
30 µg/mL	-5.52851	-5.46234	-5.49543		
40 µg/mL	6.54474	5.92601	6.235375		
50 µg/mL	-5.01541	-5.68244	-5.34892		

**Tabela 22. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 1) pelo método da adição do padrão.**

<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	31345	31628	31486.5	200.1112	0.635546
10 µg/mL	49183	50526	49854.5	949.6444	1.904832
20 µg/mL	86304	87399	86851.5	774.2819	0.891501
30 µg/mL	128493	128234	128363.5	183.1407	0.142673
40 µg/mL	164576	163249	163912.5	938.3307	0.572458
50 µg/mL	183606	183080	183343	371.9382	0.202865
<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	21196	21174	21185	15.55635	0.073431
10 µg/mL	39034	40072	39553	733.9768	1.855679
20 µg/mL	76155	76945	76550	558.6144	0.729738
30 µg/mL	118344	117780	118062	398.8082	0.337796
40 µg/mL	154427	152795	153611	1153.998	0.751247
50 µg/mL	173457	172626	173041.5	587.6057	0.339575
<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.095551	4.089293	4.092422	0.004425	0.108132
10 µg/mL	9.169796	9.465068	9.317432	0.208789	2.240843
20 µg/mL	19.72933	19.95406	19.8417	0.158905	0.800864
30 µg/mL	31.73053	31.57009	31.65031	0.113446	0.358436
40 µg/mL	41.99479	41.53055	41.76267	0.328269	0.786035
50 µg/mL	47.40812	47.17173	47.28992	0.167152	0.353462
<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-18.089	-18.2141	-18.1516		
10 µg/mL	-8.30204	-5.34932	-6.82568		
20 µg/mL	-1.35333	-0.2297	-0.79152		
30 µg/mL	5.768428	5.233639	5.501034		
40 µg/mL	4.986986	3.826378	4.406682		
50 µg/mL	-5.18376	-5.65654	-5.42015		
<b>Dia 1</b>	<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>			
200 µg/mL	10149	10454			

**Tabela 23. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 2) pelo método da adição do padrão.**

<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	32644	32566	32605	55.15433	0.169159
10 µg/mL	51200	51855	51527.5	463.1549	0.89885
20 µg/mL	88515	88420	88467.5	67.17514	0.075932
30 µg/mL	129495	129691	129593	138.5929	0.106945
40 µg/mL	164762	165494	165128	517.6022	0.313455
50 µg/mL	188580	185322	186951	2303.754	1.232277
<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	22495	22295	22395	141.4214	0.631486
10 µg/mL	41051	41584	41317.5	376.8879	0.912175
20 µg/mL	78366	78149	78257.5	153.4422	0.196073
30 µg/mL	119346	119420	119383	52.3259	0.04383
40 µg/mL	154613	155223	154918	431.3351	0.278428
50 µg/mL	178431	175051	176741	2390.021	1.352273
<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.465068	4.408175	4.436622	0.040229	0.906751
10 µg/mL	9.743557	9.895176	9.819366	0.107211	1.091827
20 µg/mL	20.35828	20.29655	20.32742	0.043649	0.214728
30 µg/mL	32.01556	32.03661	32.02609	0.014885	0.046477
40 µg/mL	42.0477	42.22123	42.13447	0.122699	0.291208
50 µg/mL	48.82304	47.86155	48.34229	0.679872	1.40637
<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-10.6986	-11.8365	-11.2676		
10 µg/mL	-2.56443	-1.04824	-1.80634		
20 µg/mL	1.791404	1.482762	1.637083		
30 µg/mL	6.718534	6.788701	6.753617		
40 µg/mL	5.119261	5.553067	5.336164		
50 µg/mL	-2.35393	-4.2769	-3.31541		
<b>Dia 2</b>	<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>			
200 µg/mL	10149	10271			

**Tabela 24. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 3) pelo método da adição do padrão.**

Dia 3		Quercetrina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	31628	33168	32398	1088.944	3.361147	
10 µg/mL	49183	50526	49854.5	949.6444	1.904832	
20 µg/mL	86304	87399	86851.5	774.2819	0.891501	
30 µg/mL	128601	128234	128417.5	259.5082	0.202082	
40 µg/mL	164576	163241	163908.5	943.9876	0.575923	
50 µg/mL	183606	183080	183343	371.9382	0.202865	
Dia 3		Quercetrina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	20989	22665	21827	1185.111	5.429564	
10 µg/mL	38544	40023	39283.5	1045.811	2.662214	
20 µg/mL	75665	76896	76280.5	870.4484	1.141115	
30 µg/mL	117962	117731	117846.5	163.3417	0.138605	
40 µg/mL	153937	152738	153337.5	847.821	0.552912	
50 µg/mL	172967	172577	172772	275.7716	0.159616	
Dia 3		Quercetrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	4.036667	4.513427	4.275047	0.33712	7.885757	
10 µg/mL	9.030409	9.451129	9.240769	0.297494	3.219366	
20 µg/mL	19.58995	19.94012	19.76503	0.24761	1.252768	
30 µg/mL	31.62186	31.55615	31.58901	0.046465	0.147091	
40 µg/mL	41.85541	41.51434	41.68487	0.241173	0.578563	
50 µg/mL	47.26873	47.15779	47.21326	0.078447	0.166154	
Dia 3		Quercetrina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-19.2667	-9.73147	-14.4991			
10 µg/mL	-9.69591	-5.48871	-7.59231			
20 µg/mL	-2.05026	-0.2994	-1.17483			
30 µg/mL	5.406213	5.187176	5.296695			
40 µg/mL	4.638519	3.785842	4.212181			
50 µg/mL	-5.46254	-5.68442	-5.57348			
Dia 3		Extrato(branco)				
Concentração	Área	Área				
200 µg/mL	10639	10503				

**Tabela 25. Precisão e Exatidão inter-dia da Quercetrina pelo método da adição do padrão.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	4.092422	4.434915	4.30757	4.278302	0.173112	4.046282
10 µg/mL	9.317432	9.817659	9.273293	9.469461	0.302355	3.192947
20 µg/mL	19.8417	20.32571	19.79756	19.98832	0.293019	1.465953
30 µg/mL	31.65031	32.02438	31.62153	31.76541	0.224737	0.70749
40 µg/mL	41.76267	42.13276	41.7174	41.87094	0.227867	0.544212
50 µg/mL	47.28992	48.34059	47.24579	47.62543	0.619735	1.30127
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-18.1516	-11.3017	-13.8486	-14.434		
10 µg/mL	-6.82568	-1.82341	-7.26707	-5.30539		
20 µg/mL	-0.79152	1.628549	-1.01221	-0.05839		
30 µg/mL	5.501034	6.747928	5.405106	5.884689		
40 µg/mL	4.406682	5.331897	4.29349	4.677356		
50 µg/mL	-5.42015	-3.31883	-5.50843	-4.74914		

**Tabela 26. Precisão e Exatidão inter-dia da Quercetrina pelo método da calibração externa.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	4.835149	5.401522	4.974083	5.070251	0.295179	5.821782
10 µg/mL	9.909935	10.38315	9.767778	10.02029	0.322185	3.215326
20 µg/mL	20.06337	20.22358	19.36967	19.88554	0.453882	2.28247
30 µg/mL	29.97569	30.34027	29.29005	29.86867	0.533228	1.785241
40 µg/mL	40.71775	40.57624	39.35065	40.21488	0.751778	1.869403
50 µg/mL	50.62169	50.41667	48.79556	49.94464	1.000396	2.003009
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-3.29702	8.03043	-0.51834	1.405024		
10 µg/mL	-0.90065	3.831474	-2.32222	0.202867		
20 µg/mL	0.316872	1.117916	-3.15163	-0.57228		
30 µg/mL	-0.08102	1.134249	-2.36649	-0.43775		
40 µg/mL	1.794372	1.440591	-1.62336	0.537199		
50 µg/mL	1.243376	0.833344	-2.40887	-0.11072		

**Tabela 27. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 1) pelo método da calibração externa.**

<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	5876	5877	5876.5	0.707107	0.012033
10 µg/mL	13749	13747	13748	1.414214	0.010287
20 µg/mL	29681	29313	29497	260.2153	0.882175
30 µg/mL	44762	44982	44872	155.5635	0.346683
40 µg/mL	61304	61764	61534	325.2691	0.528601
50 µg/mL	76803	76989	76896	131.5219	0.171039

<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.834827	4.835472	4.835149	0.000456	0.009428
10 µg/mL	9.91058	9.90929	9.909935	0.000912	0.0092
20 µg/mL	20.182	19.94475	20.06337	0.167762	0.836159
30 µg/mL	29.90478	30.04661	29.97569	0.100292	0.334579
40 µg/mL	40.56947	40.86603	40.71775	0.209702	0.515014
50 µg/mL	50.56173	50.68165	50.62169	0.084793	0.167503

<b>Dia 1</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão %bias</b>
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>
5 µg/mL	-3.30346	-3.29057	-3.29702
10 µg/mL	-0.8942	-0.9071	-0.90065
20 µg/mL	0.909999	-0.27626	0.316872
30 µg/mL	-0.31741	0.155374	-0.08102
40 µg/mL	1.423667	2.165076	1.794372
50 µg/mL	1.123461	1.363291	1.243376

**Tabela 28. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 2) pelo método da calibração externa.**

<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	6473	7037	6755	398.8082	5.903897
10 µg/mL	14262	14702	14482	311.127	2.14837
20 µg/mL	29662	29829	29745.5	118.0868	0.396991
30 µg/mL	45537	45338	45437.5	140.7142	0.309687
40 µg/mL	60689	61940	61314.5	884.5906	1.44271
50 µg/mL	76531	76625	76578	66.46804	0.086798

<b>Dia 2</b>	<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	5.219715	5.583328	5.401522	0.257113	4.760014
10 µg/mL	10.24131	10.52498	10.38315	0.200585	1.93183
20 µg/mL	20.16975	20.27742	20.22358	0.076131	0.376447



30 µg/mL	30.40442	30.27613	30.34027	0.090719	0.299005
40 µg/mL	40.17297	40.9795	40.57624	0.570299	1.4055
50 µg/mL	50.38637	50.44697	50.41667	0.042852	0.084996
<b>Dia 2</b>		<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão %bias</b>	
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	4.394301	11.66656	8.03043		
10 µg/mL	2.413126	5.249823	3.831474		
20 µg/mL	0.848752	1.38708	1.117916		
30 µg/mL	1.348076	0.920422	1.134249		
40 µg/mL	0.432435	2.448746	1.440591		
50 µg/mL	0.772742	0.893946	0.833344		

**Tabela 29. Precisão e Exatidão intra-dia da Quercetrina (Dia 3) pelo método da calibração externa.**

<b>Dia 3</b>		<b>Quercetrina</b>		<b>Calibração Externa</b>	
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	5453	6731	6092	903.6825	14.83392
10 µg/mL	13673	13382	13527.5	205.7681	1.521109
20 µg/mL	28521	28321	28421	141.4214	0.497595
30 µg/mL	43628	43989	43808.5	255.2655	0.582685
40 µg/mL	59293	59534	59413.5	170.4127	0.286825
50 µg/mL	74221	73906	74063.5	222.7386	0.30074
<b>Dia 3</b>		<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão</b>	
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	4.562117	5.386049	4.974083	0.582607	11.71286
10 µg/mL	9.861582	9.673973	9.767778	0.132659	1.358133
20 µg/mL	19.43414	19.3052	19.36967	0.091175	0.470709
30 µg/mL	29.17368	29.40642	29.29005	0.164571	0.561865
40 µg/mL	39.27297	39.42834	39.35065	0.109866	0.279197
50 µg/mL	48.89711	48.69402	48.79556	0.1436	0.29429
<b>Dia 3</b>		<b>Quercetrina</b>		<b>Exatidão %bias</b>	
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-8.75766	7.720972	-0.51834		
10 µg/mL	-1.38418	-3.26027	-2.32222		
20 µg/mL	-2.82928	-3.47399	-3.15163		
30 µg/mL	-2.75439	-1.9786	-2.36649		
40 µg/mL	-1.81758	-1.42915	-1.62336		
50 µg/mL	-2.20579	-2.61195	-2.40887		

**Tabela 30. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 1) pelo método da adição do padrão**

Dia 1		Myricitrina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	18893	19521	19207	444.0631	2.311986	
10 µg/mL	33384	33348	33366	25.45584	0.076293	
20 µg/mL	62950	63421	63185.5	333.0473	0.527094	
30 µg/mL	89194	88721	88957.5	334.4615	0.375979	
40 µg/mL	118128	117402	117765	513.3595	0.435919	
50 µg/mL	138819	137899	138359	650.5382	0.470181	
Dia 1		Myricitrina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	14198	15076	14637	620.8398	4.241578	
10 µg/mL	28689	28903	28796	151.3209	0.525493	
20 µg/mL	58255	58976	58615.5	509.824	0.869777	
30 µg/mL	84499	84276	84387.5	157.6848	0.186858	
40 µg/mL	113433	112957	113195	336.5828	0.297348	
50 µg/mL	134124	133454	133789	473.7615	0.354111	
Dia 1		Myricitrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	4.507256	4.833129	4.670193	0.230427	4.933996	
10 µg/mL	9.885647	9.965074	9.925361	0.056163	0.565857	
20 µg/mL	20.85918	21.12679	20.99299	0.189223	0.901364	
30 µg/mL	30.59975	30.51698	30.55836	0.058525	0.19152	
40 µg/mL	41.33872	41.16205	41.25038	0.124924	0.302843	
50 µg/mL	49.01826	48.76959	48.89392	0.175838	0.359633	
Dia 1		Myricitrina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-9.85488	-3.33742	-6.59615			
10 µg/mL	-1.14353	-0.34926	-0.74639			
20 µg/mL	4.295921	5.633931	4.964926			
30 µg/mL	1.999159	1.723268	1.861213			
40 µg/mL	3.346788	2.905115	3.125951			
50 µg/mL	-1.96348	-2.46082	-2.21215			
Dia 1		Extrato(branco)				
concentração	Área	Área				
200 µg/mL	4695	4445				

**Tabela 31. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 2) pelo método da adição do padrão**

Dia 2		Myricitrina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	19779	19032	19405.5	528.2088	2.721954	
10 µg/mL	32934	32739	32836.5	137.8858	0.419916	
20 µg/mL	61220	59669	60444.5	1096.723	1.814429	
30 µg/mL	85884	88241	87062.5	1666.651	1.914315	
40 µg/mL	116082	115661	115871.5	297.692	0.256916	
50 µg/mL	141177	140120	140648.5	747.4119	0.531404	
Dia 2		Myricitrina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	14724	14373	14548.5	248.1945	1.70598	
10 µg/mL	27879	28080	27979.5	142.1285	0.507974	
20 µg/mL	56165	55010	55587.5	816.7083	1.46923	
30 µg/mL	80829	83582	82205.5	1946.665	2.368047	
40 µg/mL	111027	111002	111014.5	17.67767	0.015924	
50 µg/mL	136122	135461	135791.5	467.3976	0.344202	
Dia 2		Myricitrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	4.702483	4.572208	4.637346	0.092118	1.986446	
10 µg/mL	9.585013	9.659615	9.622314	0.052752	0.548221	
20 µg/mL	20.08347	19.65479	19.86913	0.303124	1.525605	
30 µg/mL	29.23761	30.2594	29.74851	0.722512	2.428735	
40 µg/mL	40.44572	40.43644	40.44108	0.006561	0.016224	
50 µg/mL	49.75983	49.51449	49.63716	0.173476	0.349489	
Dia 2		Myricitrina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-5.95034	-8.55584	-7.25309			
10 µg/mL	-4.14987	-3.40385	-3.77686			
20 µg/mL	0.417363	-1.72605	-0.65434			
30 µg/mL	-2.54129	0.864665	-0.83831			
40 µg/mL	1.114297	1.0911	1.102698			
50 µg/mL	-0.48035	-0.97101	-0.72568			
Dia 2		Extrato(branco)				
Concentração	Área	Área				
200 µg/mL	5055	4659				

**Tabela 32. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 3) pelo método da adição do padrão**

Dia 3		Myricitrina		Adição do padrão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	19521	19233	19377	203.6468	1.050972	
10 µg/mL	33384	33348	33366	25.45584	0.076293	
20 µg/mL	62950	63292	63121	241.8305	0.383122	
30 µg/mL	88246	88721	88483.5	335.8757	0.379591	
40 µg/mL	118128	117402	117765	513.3595	0.435919	
50 µg/mL	138819	137889	138354	657.6093	0.475309	
Dia 3		Myricitrina		Adição do Padrão - Extrato		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	14508	13842	14175	470.9331	3.322279	
10 µg/mL	28371	27957	28164	292.7422	1.03942	
20 µg/mL	57937	57901	57919	25.45584	0.043951	
30 µg/mL	83233	83330	83281.5	68.58936	0.082358	
40 µg/mL	113115	112011	112563	780.6459	0.693519	
50 µg/mL	133806	132498	133152	924.8957	0.694616	
Dia 3		Myricitrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	4.622314	4.375125	4.49872	0.174789	3.885298	
10 µg/mL	9.767621	9.613963	9.690792	0.108652	1.121192	
20 µg/mL	20.74116	20.7278	20.73448	0.009448	0.045567	
30 µg/mL	30.12987	30.16587	30.14787	0.025457	0.084441	
40 µg/mL	41.22069	40.81093	41.01581	0.28974	0.70641	
50 µg/mL	48.90023	48.41476	48.6575	0.343279	0.7055	
Dia 3		Myricitrina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-7.55372	-12.4975	-10.0256			
10 µg/mL	-2.32379	-3.86037	-3.09208			
20 µg/mL	3.705786	3.638979	3.672382			
30 µg/mL	0.432889	0.552896	0.492892			
40 µg/mL	3.05172	2.027335	2.539528			
50 µg/mL	-2.19953	-3.17047	-2.685			
Dia 3		Extrato(branco)				
Concentração	Área	Área				
200 µg/mL	5013	5391				

**Tabela 33. Precisão e Exatidão inter-dia da Myricitrina pelo método da adição do padrão.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	4.670193	4.637346	4.49872	4.602086	0.091012	1.977625
10 µg/mL	9.925361	9.622314	9.690792	9.746155	0.158928	1.630679
20 µg/mL	20.99299	19.86913	20.73448	20.5322	0.5886	2.866715
30 µg/mL	30.55836	29.74851	30.14787	30.15158	0.404942	1.34302
40 µg/mL	41.25038	40.44108	41.01581	40.90242	0.416395	1.01802
50 µg/mL	48.89392	49.63716	48.6575	49.06286	0.511213	1.041955
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	-6.59615	-7.25309	-10.0256	-7.95828		
10 µg/mL	-0.74639	-3.77686	-3.09208	-2.53845		
20 µg/mL	4.964926	-0.65434	3.672382	2.660988		
30 µg/mL	1.861213	-0.83831	0.492892	0.505264		
40 µg/mL	3.125951	1.102698	2.539528	2.256059		
50 µg/mL	-2.21215	-0.72568	-2.685	-1.87428		

**Tabela 34. Precisão e Exatidão inter-dia da Myricitrina pelo método da calibração externa.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	5.869222	5.601139	5.353429	5.60793	0.257963	4.599977
10 µg/mL	10.75114	10.40607	9.712158	10.28979	0.52916	5.14257
20 µg/mL	19.53043	18.91783	17.51359	18.65395	1.033989	5.543
30 µg/mL	31.01904	30.0666	28.47234	29.85266	1.286755	4.310354
40 µg/mL	42.49466	40.29898	38.52156	40.4384	1.990217	4.921601
50 µg/mL	52.57128	50.23354	47.66774	50.15752	2.452658	4.88991
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	17.38444	12.02279	7.06858	12.1586		
10 µg/mL	7.511358	4.06072	-2.87842	2.897887		
20 µg/mL	-2.34784	-5.41087	-12.432	-6.73025		
30 µg/mL	3.396793	0.22199	-5.09219	-0.49113		
40 µg/mL	6.236659	0.747458	-3.6961	1.096007		
50 µg/mL	5.142569	0.46708	-4.66453	0.315041		

**Tabela 35. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 1) pelo método da calibração externa**

Dia 1		Myricitrina		Calibração Externa		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	13450	13629	13539.5	126.5721	0.934836	
10 µg/mL	27193	26965	27079	161.2203	0.59537	
20 µg/mL	51614	51241	51427.5	263.7508	0.51286	
30 µg/mL	83522	83058	83290	328.0975	0.393922	
40 µg/mL	114685	115548	115116.5	610.2332	0.530101	
50 µg/mL	144248	141878	143063	1675.843	1.171402	
Dia 1		Myricitrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	5.836951	5.901493	5.869222	0.045638	0.77758	
10 µg/mL	10.79224	10.71003	10.75114	0.058131	0.540696	
20 µg/mL	19.59768	19.46319	19.53043	0.0951	0.486933	
30 µg/mL	31.10269	30.93539	31.01904	0.118302	0.381384	
40 µg/mL	42.33908	42.65025	42.49466	0.220031	0.517784	
50 µg/mL	52.99856	52.14401	52.57128	0.604256	1.149403	
Dia 1		Myricitrina		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	16.73902	18.02986	17.38444			
10 µg/mL	7.922406	7.10031	7.511358			
20 µg/mL	-2.01161	-2.68407	-2.34784			
30 µg/mL	3.675633	3.117954	3.396793			
40 µg/mL	5.847696	6.625622	6.236659			
50 µg/mL	5.997115	4.288022	5.142569			

**Tabela 36. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 2) pelo método da calibração externa**

Dia 2		Myricitrina		Calibração Externa		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	12649	12943	12796	207.8894	1.624644	
10 µg/mL	26036	26208	26122	121.6224	0.465594	
20 µg/mL	49656	49801	49728.5	102.5305	0.206181	
30 µg/mL	80320	80977	80648.5	464.5692	0.576042	
40 µg/mL	109458	108596	109027	609.526	0.55906	
50 µg/mL	136778	136381	136579.5	280.7214	0.205537	
Dia 2		Myricitrina		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	5.548136	5.654143	5.601139	0.074958	1.338269	
10 µg/mL	10.37506	10.43708	10.40607	0.043853	0.421419	
20 µg/mL	18.89169	18.94397	18.91783	0.036969	0.19542	

30 µg/mL	29.94815	30.18504	30.0666	0.167509	0.557126
40 µg/mL	40.45439	40.14358	40.29898	0.219776	0.545363
50 µg/mL	50.30511	50.16197	50.23354	0.101219	0.201497
<b>Dia 2</b>		<b>Myricitrina</b>	<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	10.96272	13.08286	12.02279		
10 µg/mL	3.750631	4.370808	4.06072		
20 µg/mL	-5.54157	-5.28016	-5.41087		
30 µg/mL	-0.17283	0.616812	0.22199		
40 µg/mL	1.13597	0.358946	0.747458		
50 µg/mL	0.610226	0.323935	0.46708		

Tabela 37. Precisão e Exatidão intra-dia da Myricitrina (Dia 3) pelo método da calibração externa

<b>Dia 3</b>		<b>Myricitrina</b>	<b>Calibração Externa</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	11821	12397	12109	407.2935	3.36356
10 µg/mL	24464	23931	24197.5	376.8879	1.557549
20 µg/mL	46152	45516	45834	449.7199	0.981193
30 µg/mL	76507	75947	76227	395.9798	0.519474
40 µg/mL	103160	105035	104097.5	1325.825	1.273638
50 µg/mL	130053	128874	129463.5	833.6789	0.643949
<b>Dia 3</b>		<b>Myricitrina</b>	<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	5.249585	5.457273	5.353429	0.146857	2.743234
10 µg/mL	9.80825	9.616067	9.712158	0.135894	1.399213
20 µg/mL	17.62825	17.39893	17.51359	0.162155	0.925879
30 µg/mL	28.5733	28.37139	28.47234	0.142778	0.501461
40 µg/mL	38.18353	38.85959	38.52156	0.47805	1.240995
50 µg/mL	47.88029	47.45518	47.66774	0.300598	0.630611
<b>Dia 3</b>		<b>Myricitrina</b>	<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	4.991707	9.145453	7.06858		
10 µg/mL	-1.9175	-3.83933	-2.87842		
20 µg/mL	-11.8587	-13.0053	-12.432		
30 µg/mL	-4.75565	-5.42872	-5.09219		
40 µg/mL	-4.54118	-2.85101	-3.6961		
50 µg/mL	-4.23942	-5.08964	-4.66453		

**Tabela 25. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia 1) pelo método da adição do padrão**

<b>Dia 1</b>	<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	22192	24399	23295.5	1560.585	6.699082
10 µg/mL	50275	49481	49878	561.4428	1.125632
20 µg/mL	96036	96305	96170.5	190.2117	0.197786
30 µg/mL	148928	155430	152179	4597.608	3.021184
40 µg/mL	206810	202737	204773.5	2880.046	1.406454
50 µg/mL	247992	241385	244688.5	4671.855	1.909307
<b>Dia 1</b>	<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	19054	21184	20119	1506.137	7.486145
10 µg/mL	47137	46266	46701.5	615.89	1.31878
20 µg/mL	92898	93090	92994	135.7645	0.145993
30 µg/mL	145790	152215	149002.5	4543.161	3.04905
40 µg/mL	203672	199522	201597	2934.493	1.455623
50 µg/mL	244854	238170	241512	4726.302	1.956964
<b>Dia 1</b>	<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>
5 µg/mL	5.001744	5.40562	5.203682	0.285583	5.488099
10 µg/mL	10.32665	10.16149	10.24407	0.116781	1.139984
20 µg/mL	19.00353	19.03993	19.02173	0.025743	0.135333
30 µg/mL	29.03254	30.2508	29.64167	0.861442	2.906187
40 µg/mL	40.00772	39.22082	39.61427	0.556418	1.40459
50 µg/mL	47.81636	46.54899	47.18267	0.896168	1.899359
<b>Dia 1</b>	<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	0.034889	8.112403	4.073646		
10 µg/mL	3.266463	1.614934	2.440699		
20 µg/mL	-4.98237	-4.80034	-4.89135		
30 µg/mL	-3.22487	0.836004	-1.19444		
40 µg/mL	0.019293	-1.94794	-0.96432		
50 µg/mL	-4.36728	-6.90203	-5.63465		
<b>Dia 1</b>	<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>			
200 µg/mL	3138	3215			



**Tabela 26. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia 2) pelo método da adição do padrão**

<b>Dia 2</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	26513	23031	24772	2462.146	9.939229	
10 µg/mL	50361	49407	49884	674.5799	1.352297	
20 µg/mL	99161	98614	98887.5	386.7874	0.391139	
30 µg/mL	158535	155043	156789	2469.217	1.574866	
40 µg/mL	210407	220552	215479.5	7173.598	3.329133	
50 µg/mL	268733	262561	265647	4364.263	1.642881	
<b>Dia 2</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	23378	19934	21656	2435.276	11.24527	
10 µg/mL	47226	46310	46768	647.7098	1.384942	
20 µg/mL	96026	95517	95771.5	359.9174	0.375808	
30 µg/mL	155400	151946	153673	2442.347	1.589314	
40 µg/mL	207272	217455	212363.5	7200.468	3.390634	
50 µg/mL	265598	259464	262531	4337.393	1.652145	
<b>Dia 2</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	5.821631	5.168604	5.495117	0.46176	8.403095	
10 µg/mL	10.34352	10.16984	10.25668	0.122814	1.197407	
20 µg/mL	19.59664	19.50012	19.54838	0.068245	0.349108	
30 µg/mL	30.85472	30.1998	30.52726	0.463101	1.517007	
40 µg/mL	40.69032	42.62115	41.65574	1.365302	3.277585	
50 µg/mL	51.74969	50.58661	51.16815	0.822426	1.607301	
<b>Dia 2</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>			
5 µg/mL	16.43262	3.372078	9.902349			
10 µg/mL	3.435219	1.698364	2.566791			
20 µg/mL	-2.01682	-2.49938	-2.2581			
30 µg/mL	2.849062	0.665984	1.757523			
40 µg/mL	1.72581	6.552883	4.139347			
50 µg/mL	3.499384	1.173211	2.336298			
<b>Dia 2</b>		<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>				
200 µg/mL	3135	3097				

**Tabela 27. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia 2) pelo método da adição do padrão**

<b>Dia 3</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do padrão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	24399	21357	22878	2151.019	9.402128	
10 µg/mL	50275	49481	49878	561.4428	1.125632	
20 µg/mL	96036	96305	96170.5	190.2117	0.197786	
30 µg/mL	153447	155430	154438.5	1402.193	0.90793	
40 µg/mL	206810	202737	204773.5	2880.046	1.406454	
50 µg/mL	247992	241385	244688.5	4671.855	1.909307	
<b>Dia 3</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Adição do Padrão - Extrato</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	20291	18031	19161	1598.061	8.340177	
10 µg/mL	46167	46155	46161	8.485281	0.018382	
20 µg/mL	91928	92979	92453.5	743.1692	0.80383	
30 µg/mL	149339	152104	150721.5	1955.15	1.297194	
40 µg/mL	202702	199411	201056.5	2327.088	1.15743	
50 µg/mL	243884	238059	240971.5	4118.897	1.709288	
<b>Dia 3</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>%CV</b>	
5 µg/mL	5.236296	4.80777	5.022033	0.303013	6.033676	
10 µg/mL	10.14272	10.14045	10.14158	0.001609	0.015865	
20 µg/mL	18.8196	19.01889	18.91924	0.140915	0.744821	
30 µg/mL	29.70547	30.22975	29.96761	0.370722	1.237075	
40 µg/mL	39.82379	39.19978	39.51178	0.441246	1.116746	
50 µg/mL	47.63244	46.52794	47.08019	0.780996	1.658864	
<b>Dia 3</b>		<b>Amentoflavona</b>		<b>Exatidão %bias</b>		
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>	<b>Média</b>			
5 µg/mL	4.725914	-3.84459	0.440661			
10 µg/mL	1.427217	1.404463	1.41584			
20 µg/mL	-5.90199	-4.90557	-5.40378			
30 µg/mL	-0.98175	0.765847	-0.10795			
40 µg/mL	-0.44052	-2.00056	-1.22054			
50 µg/mL	-4.73513	-6.94412	-5.83963			
<b>Dia 3</b>		<b>Extrato(branco)</b>				
<b>Concentração</b>	<b>Área</b>	<b>Área</b>				
200 µg/mL	4108	3326				

**Tabela 28. Precisão e Exatidão inter-dia da Amentoflavona pelo método da adição do padrão.**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	5.203682	5.498973	5.063874	5.25551	0.222131	4.226635
10 µg/mL	10.24407	10.26053	10.18343	10.22934	0.040609	0.396988
20 µg/mL	19.02173	19.55224	18.96109	19.17835	0.325211	1.695718
30 µg/mL	29.64167	30.53111	30.00946	30.06075	0.446934	1.48677
40 µg/mL	39.61427	41.65959	39.55363	40.27583	1.198758	2.976372
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	4.073646	9.979459	1.277486	5.110197		
10 µg/mL	2.440699	2.605346	1.834253	2.293432		
20 µg/mL	-4.89135	-2.23882	-5.19457	-4.10825		
30 µg/mL	-1.19444	1.770374	0.031518	0.202486		
40 µg/mL	-0.96432	4.148985	-1.11594	0.689575		

**Tabela 29. Precisão e Exatidão inter-dia da Amentoflavona pelo método da Calibração externa**

<b>Exatidão</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV%</b>
5 µg/mL	5.293622	5.174719	4.87538	5.114574	0.21551	4.213646
10 µg/mL	10.27046	10.58482	9.324476	10.05992	0.656021	6.521132
20 µg/mL	20.96876	20.19856	18.06142	19.74291	1.506276	7.62945
30 µg/mL	31.27275	30.34362	28.18555	29.93398	1.583841	5.291115
40 µg/mL	42.16243	40.06512	38.21966	40.14907	1.972724	4.913499
<b>Exatidão %bias</b>						
<b>Concentração</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>Média</b>		
5 µg/mL	5.872434	3.494389	-2.49239	2.291477		
10 µg/mL	2.704615	5.848208	-6.75524	0.599195		
20 µg/mL	4.843789	0.99279	-9.69291	-1.28544		
30 µg/mL	4.242495	1.145415	-6.04816	-0.22008		
40 µg/mL	5.40608	0.1628	-4.45084	0.37268		

**Tabela 30. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia1) pelo método da Calibração externa.**

Dia 1		Amentoflavona		Calibração Externa		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	15277	15658	15467.5	269.4077	1.741766	
10 µg/mL	40569	41724	41146.5	816.7083	1.984879	
20 µg/mL	98151	94542	96346.5	2551.948	2.648719	
30 µg/mL	148270	150754	149512	1756.453	1.174791	
40 µg/mL	211962	199437	205699.5	8856.512	4.305559	
Dia 1		Amentoflavona		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	5.256701	5.330542	5.293622	0.052214	0.986354	
10 µg/mL	10.15854	10.38239	10.27046	0.158286	1.541177	
20 µg/mL	21.31849	20.61903	20.96876	0.494592	2.358711	
30 µg/mL	31.03204	31.51346	31.27275	0.340418	1.088544	
40 µg/mL	43.37617	40.9487	42.16243	1.716478	4.071108	
Dia 1		Amentoflavona		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	5.134019	6.610849	5.872434			
10 µg/mL	1.585363	3.823866	2.704615			
20 µg/mL	6.592438	3.095141	4.843789			
30 µg/mL	3.440122	5.044867	4.242495			
40 µg/mL	8.440413	2.371746	5.40608			

**Tabela 31. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia2) pelo método da Calibração externa.**

Dia 2		Amentoflavona		Calibração Externa		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	15190	14518	14854	475.1758	3.198975	
10 µg/mL	44046	41491	42768.5	1806.658	4.224272	
20 µg/mL	92623	92122	92372.5	354.2605	0.383513	
30 µg/mL	140857	148579	144718	5460.279	3.773047	
40 µg/mL	195981	193775	194878	1559.878	0.800438	
Dia 2		Amentoflavona		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	5.23984	5.109599	5.174719	0.092094	1.779684	
10 µg/mL	10.83241	10.33723	10.58482	0.350148	3.308019	
20 µg/mL	20.24711	20.15001	20.19856	0.068659	0.339921	
30 µg/mL	29.59533	31.09192	30.34362	1.058255	3.48757	
40 µg/mL	40.27889	39.85135	40.06512	0.302319	0.75457	
Dia 2		Amentoflavona		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			

5 µg/mL	4.796791	2.191988	3.494389
10 µg/mL	8.324127	3.372289	5.848208
20 µg/mL	1.235537	0.750044	0.99279
30 µg/mL	-1.34892	3.639746	1.145415
40 µg/mL	0.69723	-0.37163	0.1628

**Tabela 38. Precisão e Exatidão intra-dia da Amentoflavona (Dia 3) pelo método da Calibração externa.**

Dia 3		Amentoflavona		Calibração Externa		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	13297	13322	13309.5	17.67767	0.13282	
10 µg/mL	35368	37163	36265.5	1269.257	3.499901	
20 µg/mL	81228	81463	81345.5	166.1701	0.204277	
30 µg/mL	133372	133794	133583	298.3991	0.223381	
40 µg/mL	184039	186673	185356	1862.519	1.004834	
Dia 3		Amentoflavona		Exatidão		
Concentração	Área	Área	Média	DP	%CV	
5 µg/mL	4.872958	4.877803	4.87538	0.003426	0.070274	
10 µg/mL	9.150532	9.49842	9.324476	0.245994	2.638157	
20 µg/mL	18.03865	18.08419	18.06142	0.032205	0.17831	
30 µg/mL	28.14466	28.22645	28.18555	0.057833	0.205185	
40 µg/mL	37.96442	38.47491	38.21966	0.360974	0.944473	
Dia 3		Amentoflavona		Exatidão %bias		
Concentração	Área	Área	Média			
5 µg/mL	-2.54085	-2.44394	-2.49239			
10 µg/mL	-8.49468	-5.0158	-6.75524			
20 µg/mL	-9.80677	-9.57905	-9.69291			
30 µg/mL	-6.18447	-5.91184	-6.04816			
40 µg/mL	-5.08896	-3.81272	-4.45084			