

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

FERNANDA MIGUEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E
HIBALACTONA NAS PARTES AÉREAS DE *Hydrocotyle umbellata* L.
(ARALIACEAE)**

GOIÂNIA-GO
2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):

Nome completo do autor: Leonanda Riquel de Oliveira

Título do trabalho: Avaliação do teor de fênóis totais, flavonoides totais e hidrolato nas partes aéreas de *Hydrocotyle umbellata* L. (Asteraceae)

2. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.

Leonanda Riquel de Oliveira
(Assinatura do autor)²

Ciente e de acordo:

José Realino de Paula
(Assinatura do orientador)²

Data: 07 / 07 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

FERNANDA MIGUEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E
HIBALACTONA NAS PARTES AÉREAS DE *Hydrocotyle umbellata* L.
(ARALIACEAE)**

Trabalho de final de curso apresentado ao curso
de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
como parte dos requisitos para obtenção do
Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula
Coorientador: Prof. MSc. Matheus Gabriel de
Oliveira

GOIÂNIA-GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Miguel de Oliveira, Fernanda

Avaliação do teor de fenóis totais, flavonoides totais e hibolactona
nas partes aéreas de *Hydrocotyle umbellata* L. (Araliaceae)
[manuscrito] / Fernanda Miguel de Oliveira. - 2020.
XXXIV, 34 f.

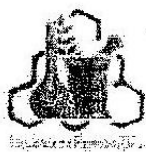
Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula; co-orientador MSc.
Matheus Gabriel de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2020.

Inclui tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Acariçoba. 2. Controle de qualidade. 3. Metabólitos secundários.
4 . CLAE. 5. Metodologia de superfície de resposta. I. Realino de Paula, José,
orient. II. Título.

CDU 615



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA



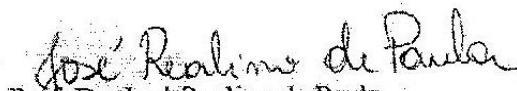
Fernanda Miguel de Oliveira

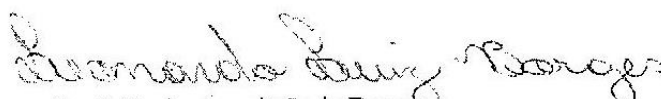
Avaliação do teor de fenóis totais, flavonoides totais e hibolactona nas partes aéreas de
Hydrocotyle umbellata L. (Araliaceae)

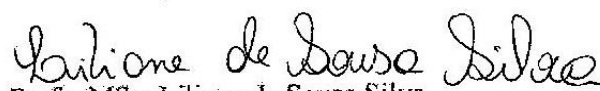
Trabalho de Final de Curso apresentado para a
obtenção de grau de Bacharel em Farmácia à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás

Data da aprovação: 07/07/2020

Membros da Banca:


Prof. Dr. José Realino de Paula
Orientador
FF/UFG


Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges
Convidado
PUC - GO


Profa. MSc. Liliane de Sousa Silva
Convidada
Doutoranda PPGCF/UFG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ter abençoado o meu caminho nos estudos e ter conseguido entrar em uma universidade e concluir a graduação em Farmácia.

Aos meus pais Israel Antônio de Oliveira e Marina Miguel pelo apoio, que apesar das dificuldades, estiveram comigo todo tempo me dando força e esperança.

Ao professor Dr. José Realino de Paula, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela paciência e orientação. Ao Laboratório LPPN por ter me disponibilizado o espaço e permitir que esse trabalho acontecesse.

Ao meu coorientador, amigo e conselheiro Matheus Gabriel de Oliveira, que sempre me incentivou a ser pesquisadora, transmitindo seu aprendizado e apoio com muito esforço e paciência, entendendo meus limites e dificuldades como aluna, que merece todo o meu reconhecimento nesse trabalho. Ao professor Dr. Leonardo Luiz pela grande contribuição nas análises estatísticas.

Aos meus colegas e amigos, Cynthia Costa, Edmar Júnior, Geovana Barbosa, Isabella Colen, Iury, Lanna Catarina e Rafaella Caroliny pelo apoio dado no meu cotidiano, presenciando meus momentos de derrotas e vitórias na graduação.

A Associação Atlética Acadêmica Jaldo de Souza Santos por ter me proporcionado momentos de lazer e saúde no dia a dia da universidade, contribuindo para o meu bem-estar físico e mental.

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro ao Projeto "Desenvolvimento de Extrato Seco Padronizado com Aplicação Ansiolítica a partir de *Hydrocotyle umbellata* L. (Araliaceae) - CHAMADA MCTIC/CNPq Nº 28/2018 – UNIVERSAL - CNPq Processo Nº 424192/2018-7"

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e da minha identidade profissional como futura farmacêutica.

RESUMO

Hydrocotyle umbellata L., popularmente conhecida como "acariçoba", é uma espécie pertencente à família Araliaceae, nativa do continente Americano. Foram comprovadas atividades ansiolítica, antinoceptiva e anti-inflamatória nas partes subterrâneas de *H. umbellata*, as quais foram, em parte, atribuídas à presença da lignana hibalactona. O objetivo deste trabalho foi realizar estudos de controle de qualidade e determinar o teor de fenóis totais, flavonoides totais e hibalactona nas partes aéreas de *H. umbellata*. Foi observada quantidade apreciável de compostos fenólicos e flavonoides (3,54% e 3,04%). A co-validação do método CLAE para quantificação de hibalactona demonstrou ser seletiva, linear e precisa, sendo útil para sua quantificação na droga vegetal de partes aéreas de *H. umbellata*. As melhores condições para a extração por ultrassom da hibalactona, obtidas a partir do planejamento Box-Benhken associado à metodologia de superfície de resposta foram: proporção sólido-liquido de 0,9 g/10 mL, graduação etanólica de 67% (v/v) e temperatura de extração de 64 °C. O teor de hibalactona encontrado nas partes aéreas foi inferior ao relatado para as partes subterrâneas, porém mais estudos devem ser realizados para investigar a possibilidade de se utilizar conjuntamente as partes subterrâneas e aéreas da planta terapeuticamente.

Palavras-chave: Acariçoba; Controle de qualidade; Metabólitos secundários; CLAE; Metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

Hydrocotyle umbellata L., popularly known as "acariçoba", is a species belonging to the family Araliaceae, native to the American continent. The anxiolytic, antinociceptive and anti-inflammatory activities were demonstrated for the subterraneous parts of *H. umbellata* and these activities were in part attributed to the presence of the lignan hibalactone. The objective of this work was to carry out quality control studies and determine the content of total phenols, total flavonoids and hibalactone in the aerial parts of *H. umbellata*. An appreciable amount of phenolic compounds and flavonoids was observed (3,54% and 3,04%). The co-validation of the HPLC method for quantification of hibalactone proved to be selective, linear and accurate, being useful for its quantification in the plant drug of aerial parts of *H. umbellata*. The best conditions for the ultrasound extraction of hibalactone, obtained from the Box-Benhken design associated with the response surface methodology were: solid-liquid ratio of 0.9 g/10 mL, 67% ethanol content (v/v) and extraction temperature of 64 °C. The content of hibalactone found in the aerial parts was lower than that reported for the subterraneous parts, however more studies must be carried out to investigate the possibility of using therapeutically the subterraneous and aerial parts of the plant.

Keywords: Acariçoba; Quality control; Secondary metabolites; HPLC; Response surface methodology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva padrão para o doseamento de fenóis totais na droga vegetal das partes aéreas <i>Hydrocotyle umbellata</i> L.....	19
Figura 2: Curva padrão para o doseamento de flavonoides totais na droga vegetal das partes aéreas <i>Hydrocotyle umbellata</i> L.....	20
Figura 3: Perfil cromatográfico 2D a 290nm do padrão de hibalactona (concentração de 0,05 mg/mL) (A) e do extrato da droga vegetal (B) com os espectros de absorção no ultravioleta.....	21
Figura 4: Curva de calibração da hibalactona.....	22
Figura 5: Gráfico de superfície de resposta do teor de hibalactona em função da proporção sólido-líquido e graduação etanólica.....	25
Figura 6: Correlação entre valores experimentais e valores preditos para o teor de hibalactona.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores codificados e seus níveis empregados no planejamento fatorial Box-Behnken.....	16
Tabela 2: Matriz experimental do planejamento fatorial Box-Behnken para avaliação da influência dos fatores de extração por ultrassom da hibalactona.....	16
Tabela 3: Precisão ao nível de repetibilidade.....	23
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão polinomial quadrática.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO GERAL	11
2.1 Objetivos específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Obtenção do material vegetal	11
3.2 Caracterização da droga vegetal	11
3.2.1 Determinação de cinzas totais	11
3.2.2 Determinação de umidade	12
3.2.3 Índice de Intumescências	12
3.3 Determinação do teor de fenóis totais	12
3.4 Determinação do teor de flavonoides totais	13
3.5 Determinação do teor de hibalactona por CLAE	14
3.6 Co-validação do método CLAE	14
3.6.1 Seletividade	14
3.6.2 Linearidade	14
3.6.3 Precisão (Repetibilidade)	15
3.7 Planejamento e Otimização da extração da hibalactona por ultrassom	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Caracterização da droga vegetal	18
4.1.1 Determinação de cinzas totais	18
4.1.2 Determinação de umidade	18
4.1.3 Determinação do Índice de Intumescência.....	18
4.2 Determinação do teor de fenóis totais	19
4.3 Determinação do teor de flavonoides totais	20
4.4 Co-validação do método CLAE	21
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças é relatado desde o período neolítico (em torno 10.000 anos atrás), sendo passado o conhecimento do seu uso ao longo das gerações e ainda é aplicado nos dias atuais por toda população mundial (ALVES, 2013).

A fitoterapia estuda o uso das plantas para tratamento ou prevenção de doenças, que possui efeito farmacológico comprovado cientificamente. Com a evolução dos estudos científicos adjuntos as comprovações das ações terapêuticas das plantas, o mercado de medicamentos fitoterápicos vem crescendo ao longo dos anos, girando em torno de 22 bilhões de dólares no comércio mundial de fitoterápico por ano (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Os fitoterápicos devem possuir um padrão de qualidade necessário a um medicamento, para isso é necessário que sejam feitas análises físico-químicas e microbiológicas, quanto da matéria prima tanto do produto final, para que este medicamento garanta segurança e eficácia ao consumidor (MOUSINHO; OLIVEIRA, 1986; STICHER, 1993; WANG; YAO; ZENG, 2003; BARA; CIRILO; OLIVEIRA, 2004).

A família Araliaceae é constituída por 43 gêneros e 1.450 espécies e é amplamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. As espécies dessas famílias são compostas por arbustos, árvores, ervas, lianas e epífitas (JUDD et al., 2009). Atualmente essa família vem sendo alvo de estudo científico devido a grandes quantidades de gêneros e espécies com propriedades medicinais (APG IV, 2016).

A espécie *Hydrocotyle umbellata* L., popularmente conhecida como "acariçoba" e "erva-do-capitão", pertence ao gênero *Hydrocotyle* L. e a família Araliaceae. Esta espécie possui características de uma planta acaule, herbácea, perene, prostrada, rizomatosa, podendo ser encontrada em solo pantanoso, arenoso, restinga ou meio aquático (SANTANA et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002).

Estudos realizados com as partes subterrâneas da espécie de *H. umbellata* comprovaram atividades ansiolítica, anti-inflamatória e antinociceptiva, e estas atividades foram atribuídas, em parte, a presença da hibalactona na planta (OLIVEIRA et al., 2017). Hibalactona é uma lignana da classe das dibenzilbutirolactonas, podendo ser encontrada em espécies da família Araliaceae, Cupressaceae e Rutaceae. Diversas atividades biológicas estão relacionadas para essa lignana, incluindo:

atividade anticolinesterásica (JUNG et al., 2015), antiestrogênica (LEE et al., 2005), anti-inflamatória (BAN et al., 2002), antimicrobiana (BASTOS; ALBUQUERQUE; SILVA, 1999), antioxidante, antitumoral (CHANG et al., 2000; MANSOOR et al., 2013), larvicida (MATSUBARA, 1972) e neuroprotetora (YOON et al., 2008;).

Para a extração da hibalactona, alguns métodos clássicos são citados na farmacopeia, como maceração, percolação e refluxo são geralmente utilizados (LIM et al., 2009; JUNG et al., 2015; CUCA-SUAREZ; DELLA- MONACHE; COY-BARRERA, 2015). Um método atualmente está sendo utilizado é o por ultrassom (YOON et al., 2008; JEONG et al., 2014), este método destaca-se por ser mais rápido, consumo menor de solvente e otimização da eficiência de extração. O método por ultrassom consiste na geração de ondas mecânicas que criam uma variação na pressão do solvente, gerando calor e formação de microbolhas que colapsam, promovendo uma fragmentação da célula vegetal e consequente liberação dos fitoconstituintes (CHEMAT et al., 2017).

Diversos fatores podem influenciar os processos de extração de plantas, como natureza do solvente, temperatura e tempo (SASIDHARAN et al., 2011). Esses fatores podem interferir no rendimento da extração, de forma positiva ou negativa, portanto é necessário que a definição e padronização dos mesmos sejam feitos de modo planejado (SOUSA et al., 2014).

Apesar do potencial terapêutico da hibalactona, não há estudos que relatam sua quantificação nas partes aéreas de *H. umbellata*, bem como a otimização da extração da parte aérea da planta. O conhecimento das condições de extração adequadas para a obtenção de maiores quantidades deste composto bioativo apresenta importância por gerar subsídios para controle de qualidade de *H. umbellata*, essencial para a obtenção de futuros produtos com potencial terapêutico.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o teor de fenóis totais, flavonoides totais e hibolactona nas partes aéreas de *Hydrocotyle umbellata* L.

2.1 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar a droga vegetal de *H. umbellata*.
- Realizar o doseamento de flavonoides totais e fenóis totais na droga vegetal.
- Co-validar método analítico para quantificação da hibolactona na droga vegetal das partes aéreas de *Hydrocotyle umbellata* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Otimizar a extração de hibolactona das partes aéreas de *H. Umbellata*.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Obtenção do material vegetal

Para a realização do estudo proposto foi utilizada a espécie *H. umbellata* cultivada na zona rural de Hidrolândia, Goiás (16°54'01.0" S e 49°15'32.5" W), Condomínio de Chácaras Miraflores. Uma exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, UFG – 22394. O material vegetal correspondente as partes aéreas foi posteriormente lavado com água corrente, dessecado em estufa com circulação forçada de ar a 40°C e triturado. A droga vegetal obtida na forma de pó foi acondicionada ao abrigo de luz e umidade e sob refrigeração a -18°C.

3.2 Caracterização da droga vegetal

3.2.1 Determinação de cinzas totais

Uma amostra de 3 g do material foi pesada em balança analítica e transferida para um cadinho, previamente calcinado em mufla a 450 °C. A amostra foi uniformemente distribuída no cadinho e incinerada a temperatura de 450 °C durante 4h, resfriada em dessecador e novamente pesada (BRASIL, 2010). O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação à amostra seca ao ar conforme equação abaixo:

$$\text{Teor de cinzas totais} = 100 \times \frac{N}{P}$$

Em que:

N= massa de cinzas totais da amostra em gramas;

P= massa da amostra em gramas.

3.2.2 Determinação de umidade

Para a determinação de umidade foi utilizada uma balança com elemento de aquecimento halógeno marca Ohaus® modelo MB35. Foi pesado 0,5 g da amostra submetida ao aquecimento a 105 °C até peso constante. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3 Índice de Intumescência

Uma amostra de 1 g do material vegetal foi colocada em uma proveta de 25 mL com escala de 0,2 mL e tampa esmerilhada. O volume ocupado pelo pó foi medido. Em seguida, foram adicionados 25 mL etanol 67% (v/v) e a proveta foi agitada a cada 10 min durante 1h. Após repouso de 3 h à temperatura ambiente (22°C), foi verificado o volume final ocupado pelo material vegetal (BRASIL, 2010). O experimento foi realizado em triplicata. O índice de intumescência foi obtido de acordo com a equação:

$$\text{Índice de intumescência} = (V2-V1)/V1$$

Em que:

V2= volume final do pó;

V1= volume inicial do pó.

3.3 Determinação do teor de fenóis totais

O doseamento de fenóis totais foi realizado pelo método de HAGERMAN e BUTLER (1978) adaptado por WATERMAN e MOLE (1987). Para extração dos compostos fenólicos foi pesado 1 g da droga vegetal para um balão de fundo redondo de 250 mL e 150 mL de água destilada foram adicionados. A mistura foi aquecida até a fervura e mantida sob refluxo entre 80°C e 90°C durante 30 min. O extrato aquoso resultante foi resfriado e transferido para um balão volumétrico de 250 mL, onde teve

seu volume completado com água destilada. A mistura resultante foi filtrada em papel de filtro qualitativo, e foram desprezados os 50 mL iniciais.

Em um tubo de ensaio foram acrescentados 1 mL de solução de laurilsulfato de sódio/trietanolamina, 0,5 mL da solução de cloreto férrico e 0,5mL do extrato preparado anteriormente. Após 15 min de repouso, a leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm. Utilizou como branco uma mistura de 1 mL de laurilsulfato de sódio/trietanolamina, 0,5 mL da solução de cloreto férrico e 0,5mL de água destilada. A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,050; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 e 0,300 mg/mL. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata. A partir da equação obtida da curva padrão, será possível calcular a concentração (mg/mL) de fenóis totais no extrato e a porcentagem presente na droga vegetal.

3.4 Determinação do teor de flavonoides totais

O doseamento de flavonoides totais foi determinado, como equivalentes de rutina, usando o método proposto por Rolim et al. (2005), modificado. Para extração dos flavonoides foram pesado 0,5 g da droga vegetal e transferidos para um balão de fundo redondo de 250 mL. Foram adicionados 100 mL de solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1) e a mistura foi aquecida em banho-maria sob refluxo a 90-100 °C por 40 min. O balão foi resfriado em água corrente o extrato foi filtrado através de papel de filtro.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL do extrato e a leitura da absorbância foi realizada em 361nm. Foi utilizado como branco a solução de metanol: ácido acético 0,02M (99: 1). Para o preparo da curva padrão foram pesados 10 mg de rutina para um balão volumétrico de 100 mL cujo volume foi completado com solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1). Foram retiradas alíquotas de 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 e 0,035 mg/mL, transferidas para tubos de ensaio devidamente identificados e completado o volume para 2 mL com a solução de metanol: ácido acético 0,02M (99:1). A mistura foi homogeneizada e a leitura da absorbância foi realizada a 361 nm. Desta forma, foi plotada uma curva da absorbância em função da concentração de rutina. A partir da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de flavonoides totais no extrato e a porcentagem presente na droga vegetal.

3.5 Determinação do teor de hibalactona por CLAE

A determinação do teor da hibalactona foi realizada conforme método analítico proposto por OLIVEIRA et al. (2019). As análises procederam utilizando um Sistema Cromatográfico da marca Waters® modelo HPLC Alliance® com módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodo (DAD) 2998 e sistema de processamento de dados Empower 2.0. As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel empregada foi uma mistura de metanol grau HPLC, acetonitrila grau HPLC e água ultrapura (Mili-Q®) na proporção 65:10:25, respectivamente, com modo de eluição isocrático e vazão de 0,8 mL/min por 20 min, e detecção a 290 nm. O volume de injeção foi de 10 µL. As análises foram realizadas a temperatura ambiente (25 °C). A fase móvel foi previamente filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Millex®) e desgaseificada usando banho de ultrassom (USC 1800A, 40 kHz, Uniques).

3.6 Co-validação do método CLAE

O método foi co-validado quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e precisão (repetibilidade), conforme a RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017) para Categoria I referentes aos testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

3.6.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através da varredura pelo detector DAD na faixa de absorção no ultravioleta (UV) de 190 a 400 nm, sendo determinado o perfil de absorção do padrão de hibalactona e do extrato da droga vegetal. Também foi determinado o perfil de absorção do diluente metanol (grau HPLC) para verificação de interferência em relação ao pico do marcador hibalactona.

3.6.2 Linearidade

Para a construção da curva-padrão foram preparadas, em triplicata, cinco concentrações de hibalactona (isolada em estudo de OLIVERA et al. 2019): 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL em metanol grau HPLC. As soluções padrão foram filtradas em membrana de 0,45 µm Millex® e injetadas no cromatógrafo.

As médias das aéreas de cada concentração dos marcadores foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a equação:

$$y = ax + b$$

Em que:

a= Inclinação da reta em relação aos eixos (coeficiente angular);

b= Interseção da reta com o eixo y (coeficiente linear).

A curva foi plotada no programa Microsoft Excel 2013. Os resultados dos testes foram tratados com o auxílio do software Design Expert 7.0, realizando-se os testes de significância da regressão, por análise de variância (ANOVA), e de normalidade dos resíduos pelo método de Anderson-Darling. Todos estes foram calculados com um nível de significância de 5%.

3.6.3 Precisão (Repetibilidade)

A precisão foi avaliada pela determinação de seis réplicas a 100% (0,019 mg/mL de hibalactona) da concentração da amostra (0,04 g/mL). A amostra foi preparada utilizando-se 1 g da droga vegetal com 25 mL de metanol grau HPLC em banho ultrassônico por 15 minutos.

As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millex®) e injetadas no cromatógrafo. A precisão foi determinada por meio da análise do DPR, calculado conforme equação:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Em que:

DPR= Desvio padrão relativo;

DP= Desvio padrão;

CMD= Concentração média determinada.

3.7 Planejamento e otimização da extração da hibalactona por ultrassom

O processo de otimização da extração da hibalactona foi realizado em banho de ultrassom (USC 1800A, 40 kHz, Uniques) e conduzido por planejamento Box-Behnken (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Os fatores proporção sólido-líquido (PSL), graduação etanólica (GE) e temperatura (T) tiveram seus efeitos avaliados em três níveis, tendo como ponto de partida o estudo realizado para otimização da extração da hibalactona nas partes subterrâneas da acariçoba (OLIVEIRA et al., 2019) (Tabela 1). O tempo de extração foi fixado em 15 minutos.

Tabela 1. Fatores codificados e seus níveis empregados no planejamento fatorial Box-Behnken.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Proporção sólido-líquido (g/mL)	0,25:10	0,625:10	1:10
Graduação etanólica (% v/v)	60	70	80
Temperatura (°C)	45	55	65

A matriz de planejamento fatorial com os fatores e níveis analisados, consistiu na combinação de 17 experimentos, escolhidos de maneira aleatória, incluindo 5 pontos centrais (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz experimental do planejamento fatorial Box-Behnken para avaliação da influência dos fatores de extração por ultrassom da hibalactona.

Experimento	Proporção sólido-líquido	Graduação etanólica	Temperatura
1	-1	-1	0
2	-1	+1	0
3	+1	-1	0
4	+1	+1	0
5	0	-1	-1
6	0	+1	-1
7	0	-1	+1

8	0	+1	+1
9	0	0	-1
10	+1	0	-1
11	-1	0	+1
12	+1	0	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Os resultados experimentais obtidos no planejamento foram analisados por ANOVA e regressão linear utilizando a MSR e empregando o software Design Expert 7.0. O modelo polinomial quadrático de resposta encontrado consistiu em uma equação polinomial linear, dada pela equação abaixo. Ao final do processo, a condição ótima de extração da hibalactona foi testada em triplicata por meio de experimento comprobatório. Foi considerado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Onde:

y = variável dependente (resposta predita); β_0 = constante do modelo;

x_i = conjunto de variáveis independentes; x_j = coeficientes dos fatores de interação;

β_i = coeficientes lineares;

β_{ii} = coeficientes quadráticos; β_{ij} = coeficientes de interação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização da droga vegetal

4.1.1 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas totais do pó da planta permite quantificar os resíduos não voláteis inorgânicos presentes nas drogas vegetais, que são constituídos principalmente por carbonetos, cloretos e óxidos (COSTA, 1982).

Na monografia de algumas drogas vegetais na Farmacopeia Brasileira, são definidos limites para o teor de cinzas. Por exemplo, para as partes aéreas da espécie *Centella asiatica* L., planta pertencente à família Apiaceae, semelhante morfológicamente e as vezes até confundida com plantas do gênero *Hydrocotyle*, o limite máximo é 11% (BRASIL, 2019). Para a parte aérea de *H. umbellata*, o valor encontrado para o teor de cinzas totais foram 9,62%, considerando assim um valor satisfatório na análise, dentro do preconizado para a *C. asiatica*.

4.1.2 Determinação de umidade

O teor de umidade tem como objetivo avaliar a qualidade do material vegetal, onde os processos de secagem inadequados podem levar a contaminação por microrganismos, levando a destruição e/ou alteração dos princípios ativos, comprometendo a qualidade do material (BRAGA et. al., 2007).

Para a *C. asiática* a farmacopeia brasileira preconiza o limite máximo de umidade de 12% (BRASIL, 2019). O teor de umidade encontrados na parte aérea de *Hydrocotyle umbellata* L. foi de 8,92%, comparando os resultados de *H. umbellata* com o preconizado para a *C. asiática*, o resultado obtido foi satisfatório nesta análise.

4.1.3 Índice de Intumescência

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), o índice de intumescência mede o volume ocupado por 1 g da droga seca, para analisar o teor de mucilagens no material vegetal. A presença de mucilagens, é indicada quando o material vegetal em contato com o extrato hidroalcoólico absorve a água presente neste e expande o seu tamanho (WHO, 2011). As mucilagens podem apresentar atividade antidiarreica (COSTA, 1982), emoliente e expectorante (BARROSO; OLIVEIRA, 2009). O índice de intumescência para a parte aérea de *Hydrocotyle umbellata* L. foi de 0,44.

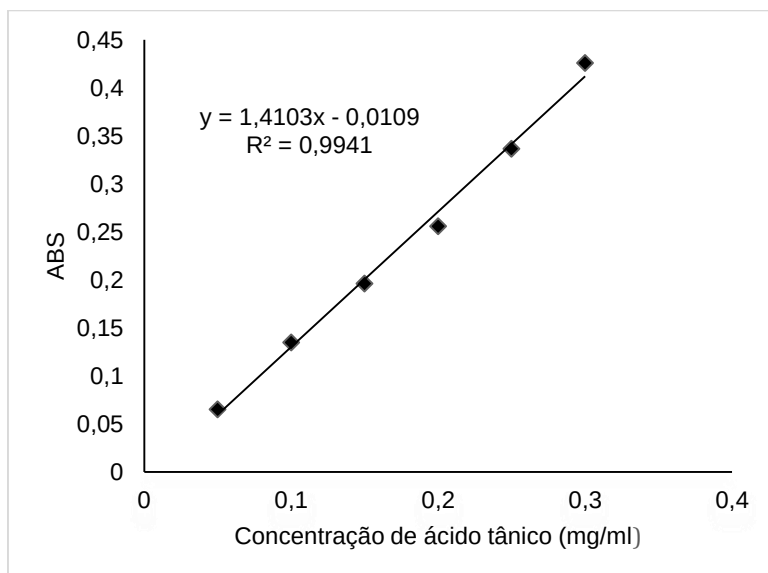
4.2 Determinação do teor de fenóis totais

Diversas reações oxidativas ocorrem nas células aeróbicas no organismo humano, levando à formação de radicais livres, contribuindo para o aparecimento de doenças como neoplasias, processos inflamatórios e doenças cardiovasculares. (SIKORA et al., 2008). Os fenóis possui em sua maioria uma função elevada de atividade antioxidante (IMEH; KHOKHAR, 2002), o uso de fitoterápicos contendo altos teores de fenóis podem causar a inibição da formação de radicais livres, sendo benéficos a saúde (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

Em estudos realizados por HAMDY et. al., (2018), foram identificados alguns compostos fenólicos nas partes aéreas de *H. umbellata*, tais como ácido 1-O-cafeoilquínico, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico e ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico.

Para a quantificação de fenóis totais, foi construída uma curva padrão de ácido tânico, conforme representado na figura 1, e a partir da equação obtida da curva padrão foi possível calcular a concentração (mg/mL) de fenóis totais da droga vegetal. O resultado encontrado de fenóis totais nas partes aéreas de *H. umbellata* foi de 3,54%.

Figura 1. Curva padrão para o doseamento de fenóis totais na droga vegetal das partes aéreas *Hydrocotyle umbellata* L. Concentração de ácido tânico em mg/mL versus absorbância (ABS). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata.



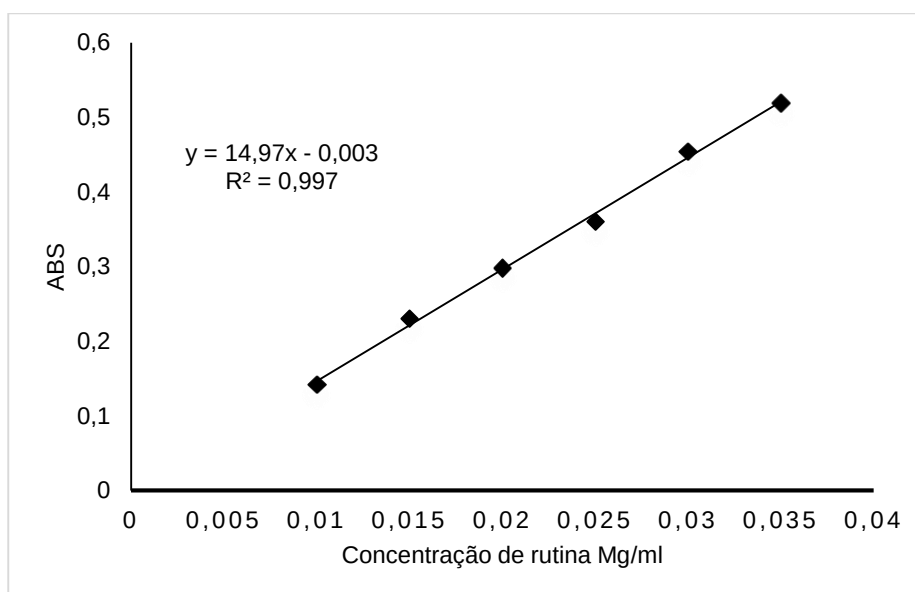
4.3 Determinação do teor de flavonoides totais

Flavonoides são compostos fenólicos, que possui atividade antioxidante que podem causar inibição ou retardamento da oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando reações de oxidação em cadeia e a formação de radicais livres. (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004). Os antioxidantes podem ser utilizados para a prevenção de doenças cardiovasculares, inflamação e câncer. (MARCHAND, 2002). Atribui-se ainda aos flavonoides atividades anti-inflamatória, analgésica e antivaricosa (BARROSO; OLIVEIRA, 2009).

HAMDY et. al., (2018) identificaram alguns flavonoides encontrados nas partes aéreas de *H. umbellata*, tais como, quercetina, quercetina-O-di-raminosídeo, quercetina-O-hexosídeo, quercetina-O-pentosídeo, canferol-O-rutinosídeo e rutina.

Para a quantificação de flavonoides totais, foi construída uma curva padrão de rutina, conforme representado na figura 2 e através da equação obtida da curva padrão, foi possível calcular a concentração (mg/mL) de flavonoides totais da droga vegetal. O resultado encontrado de flavonoides totais nas partes aéreas de *H. umbellata* foi de 3,04%.

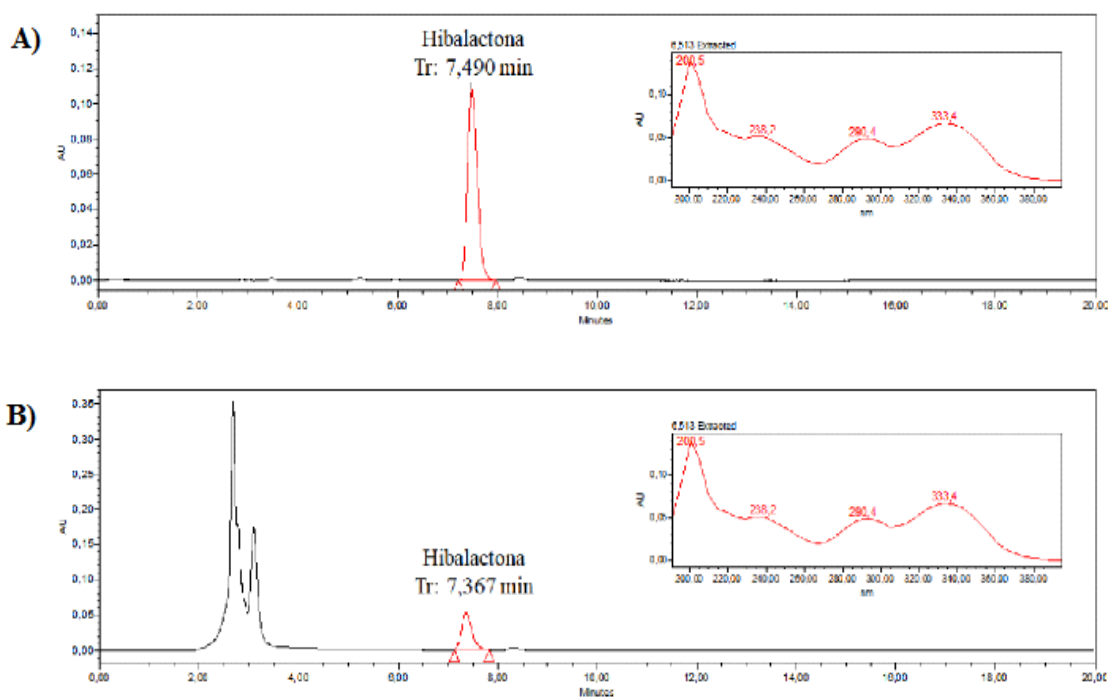
Figura 2. Curva padrão para o doseamento de flavonoides totais na droga vegetal das partes aéreas *Hydrocotyle umbellata* L. Concentração de rutina em mg/mL versus absorvância (ABS). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata.



4.4 Co-validação do método CLAE

Na análise da seletividade do método, o pico correspondente ao padrão de hibalactona foi observado com tempo de retenção de aproximadamente 7 min, o que também foi verificado no extrato. O espectro de absorbância na região do ultravioleta determinado para o padrão de hibalactona, através do detector DAD, revela regiões de absorbância equivalentes do padrão com o extrato da droga vegetal (Figura 2). Os espectros de absorção demonstram que o método é capaz de mensurar o composto hibalactona na presença de outros constituintes, sendo seletivo conforme definição da RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017).

Figura 3. Perfil cromatográfico 2D a 290 nm do padrão de hibalactona (concentração de 0,05 mg/mL) **(A)** e do extrato da droga vegetal **(B)** com os espectros de absorção no ultravioleta. Fonte: Programa Empower 2.0.

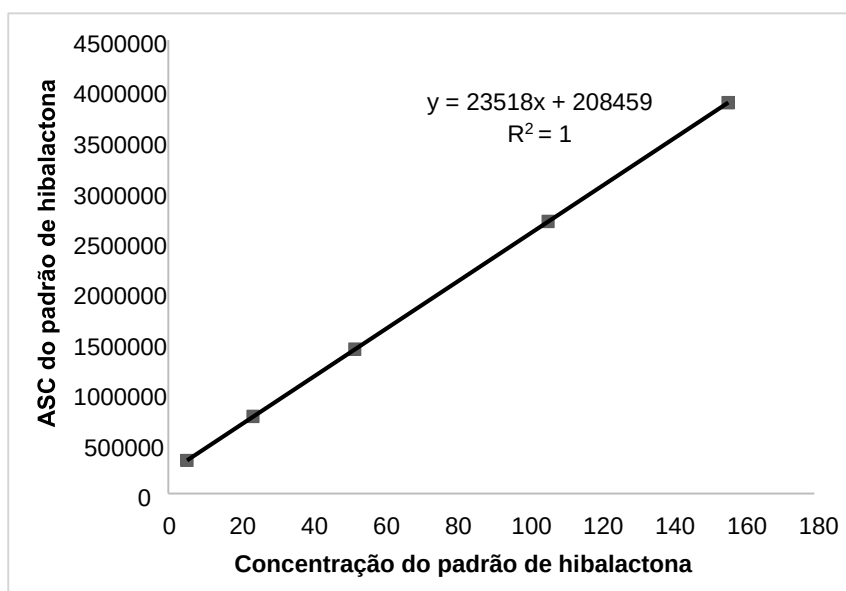


A seletividade para o diluente metanol foi realizada também por varredura no sistema detector DAD e não exibiu máximos de absorção que pudessem interferir na detecção do marcador hibalactona a 290 nm conforme o método co-validado. Portanto, não apresentou interferências nos cromatogramas do extrato ou do padrão de hibalactona.

A curva de calibração obtida é apresentada na Figura 4. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos foi menor que 5% em todos os pontos da curva. Segundo a RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2017), o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é 0,99. Para este atributo ao método foi considerado linear apresentando um coeficiente de correlação igual a 1,0 ($r = 1,0$), o que demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Obteve-se a seguinte equação da reta:

$$y = 23518x + 208459$$

Figura 4. Curva de calibração da hibalactona.



Os resultados que expressam o parâmetro de precisão ao nível de repetitividade estão descritos na Tabela 3. Para um limite de coeficiente de variação de no máximo 5% (BRASIL, 2017), os resultados apresentaram desvio padrão relativo igual a 1,43%, evidenciando a confiabilidade do método desenvolvido e validado para quantificação da hibalactona nas partes aéreas de *H. umbellata*.

Tabela 3. Precisão ao nível de repetibilidade.

Concentração	Massa (mg)	Concentração (mg/mL)	Area (μAU s)	Concentração de hibalactona (mg/mL)	Teor de hibalactona (%)	DP (%)	DPR (%)
100% (0,019 mg mL ⁻¹)	1002	40,080	675049	0,0198	0,0495	0,0006	1,43
	1003	40,140	665341	0,0194	0,0484		
	1002	40,100	675549	0,0199	0,0495		
	1001	40,056	666467	0,0195	0,0486		
	1000	40,032	657385	0,0191	0,0477		
	1001	40,048	667385	0,0195	0,0487		

A influência dos fatores de extração sobre a resposta investigada (teor de hibolactona) foi avaliada por ANOVA (Tabela 4). Em relação ao modelo gerado, o valor do coeficiente de correlação ($r = 0.99$) indica uma boa correlação entre os valores experimentais e preditos da resposta. Além disso, a contribuição do modelo de regressão polinomial quadrático gerado foi significativa ($p < 0,0001$) e a falta de ajuste foi insignificante ($p = 0,3731$), revelando que o modelo pode ajustar adequadamente os dados experimentais.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão polinomial quadrática referente ao planejamento fatorial Box-Benhken.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	P
Linear					
PSL	0.000722	1	0.000722	476.21	< 0.0001
GE	0.000034	1	0.000034	22.67	0.0021
T	0.000076	1	0.000076	50.22	0.0002
Quadrático					
PSL ²	0.00030	1	0.00030	202.94	< 0.0001
GE ²	0.00002	1	0.00002	18.39	0.0036
T ²	6.544E-006	1	6.544E-006	4.31	0.0765
Interação					
PSL x GE	2.823E-007	1	2.823E-007	0.19	0.6792
PSL ² x GE	8.238E-006	1	8.238E-006	5.43	0.0526
PSL x GE ²	7.182E-006	1	7.182E-006	4.73	0.0661
Modelo	0.001719	9	0.000190	125.81	< 0.0001
Falta de ajuste	5.378E-006	3	1.793E-006	1.37	0.3731
Erro puro	5.246E-006	4	1.312E-006		
total	0.001729	16			
R ²	0.9939				
R ² ajustado	0.9860				

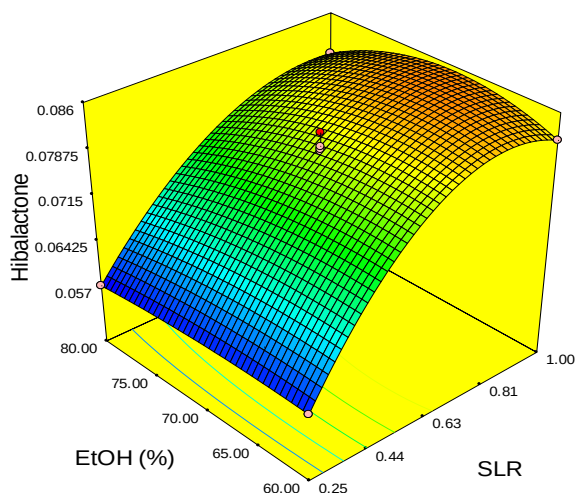
A ANOVA também revela que todos os três fatores avaliados tiveram um efeito linear significativo sobre o teor de hibolactona. Entre os fatores, verificou-se que a proporção sólido-líquido (PSL) apresentou maior influência na extração de hibolactona ($p < 0,001$), seguida da temperatura (T) ($p = 0.0002$) e graduação etanólica (GE) ($p = 0.0021$). A PSL e a GE também exibiram comportamentos quadráticos significativos sobre a resposta. O efeito interativo desses dois fatores (PSL x ES) foi o único com valor de significância ($p = 0.0526$) mais próximo do estabelecido como

critério nesse trabalho ($p \leq 0,05$). A equação obtida para a resposta avaliada, com coeficiente de correlação de $r = 0,9909$, é mostrada na equação abaixo:

$$\text{Hib. } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 0.093 - 0.0029\text{PSL} + 0.0030\text{GE} - 0.0002T - 0.0025\text{PSL}^2 + 0.0012\text{GE}^2$$

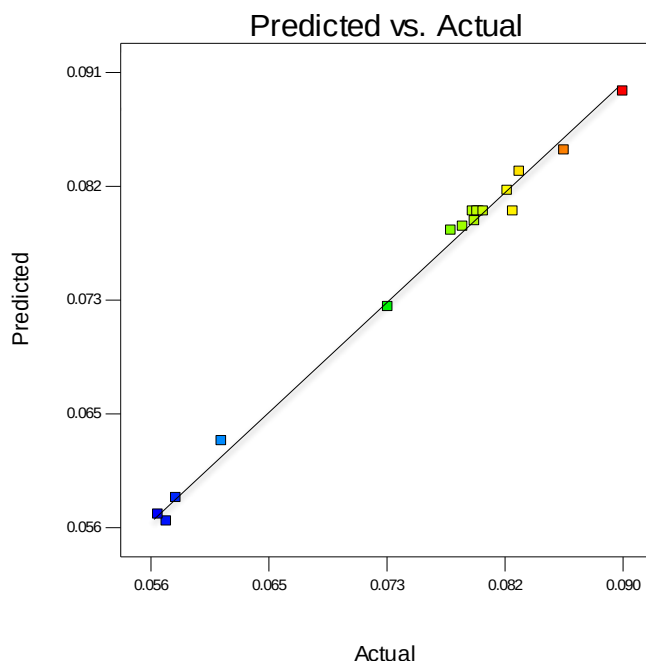
A Figura 5 mostra o gráfico de superfície de resposta para o teor de hibalactona em função da PSL e GE, e evidencia que níveis maiores de PSL (0,9 g/10 mL) podem promover maior teor de hibalactona, o que também está associado a níveis menores de GE (67%, v/v).

Figura 5. Gráfico de superfície de resposta do teor de hibalactona em função da proporção sólido-líquido e graduação etanólica.



Os resultados experimentais demonstraram boa concordância com os dados preditos, como pode ser visto na Figura 6. Dessa forma, os modelos estatísticos gerados foram capazes de explicar a influência dos principais fatores que afetam a eficiência da extração de hibalactona nas partes aéreas de *H. umbellata*.

Figura 6. Correlação entre valores experimentais e valores preditos para o teor de hibalactona.



As melhores condições para a extração por ultrassom da hibalactona nas partes aéreas da acariçoba, dentro da faixa de valores investigada, obtidas a partir do planejamento Box-Benhken associado à metodologia de superfície de resposta foram: PSL de 0,9 g/10 mL, GE de 67% (v/v) e ET de 64 ° C. O valor predito de concentração de hibalactona, nessas condições, foi de 90,00 µg/mL. Os experimentos independentes, realizados em triplicata, resultaram em uma média de conteúdo de hibalactona de 87,79 µg/mL, o que corresponde a 97,54% do valor predito, demonstrando que o modelo foi adequado para predizer os dados.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2019) nas partes subterrâneas de *H. umbellata* mostraram uma concentração de hibalactona de 207,005 µg/mL, utilizando o mesmo método de validação, ou seja, as partes subterrâneas possui uma concentração mais elevada de hibalactona. Porém, mais estudos devem ser conduzidos a fim de verificar a possibilidade de as partes aéreas da planta também apresentar as atividades biológicas verificadas nas partes subterrâneas ou ainda da associação das partes das plantas.

5. CONCLUSÕES

A co-validação do método CLAE para quantificação de hibalactona demonstrou ser seletiva, linear e precisa, sendo útil para sua quantificação em extratos de partes aéreas de *H. umbellata*. As melhores condições para a extração por ultrassom da hibalactona, obtidas a partir do planejamento Box-Benhken associado à metodologia de superfície de resposta foram: proporção sólido-liquido de 0,9 g/10 mL, graduação etanólica de 67% (v/v) e temperatura de extração de 64 °C. O conhecimento das condições de extração adequadas para a obtenção de maiores quantidades de hibalactona apresenta importância por gerar subsídios para controle e padronização da qualidade dos extratos das partes aéreas de *H. umbellata*, essencial para a obtenção de futuros produtos com potencial terapêutico.

Embora o teor de hibalactona nas partes aéreas de *H. umbellata* foi inferior ao da parte subterrânea, nas partes aéreas foram encontrados teores significativos de fenóis totais e flavonoides totais, sendo sugestivo mais estudos com a associação das duas partes da planta para investigação das atividades farmacológicas.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, L. F. **Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas**. Rev. Virtual Quim., p. 450-513, 2013.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, n. 1, p.1-20, 2016.

BAN, H. S.; LEE, S.; KIM, Y. P.; YAMAKI, K.; SHIN, K. H.; OHICHI, K. Inhibition of prostaglandin E2 production by taiwanin C isolated from the root of *Acanthopanax chiisanensis* and the mechanism of action. **Biochemical Pharmacology**, v.64, n. 1, p. 1345-1354, 2002.

BARA MTF, Cirilo HNC, Oliveira. **Determinação de ginkgoflavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados**. Revista Eletrônica de Farmácia, 2004.

BARROSO, Isabel Cristina Ercolini; OLIVEIRA, Fernando de. **Caracterização farmacognóstica dos frutos de *Cordia sellowiana* Cham. e de *Cordia myxa* L.(Boraginaceae Jussieu)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 2A, p. 458-470, 2009.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, v. 65, n.1, p. 541-544, 1999.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. New York: John Wiley & Sons. 1978.

BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, J.T.; DORES, R.G.R.; NAGEM, T.J. **Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.28, 2007.

BRASIL 2019. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 298 de 12/08/2019. **Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira**, 6ª edição. Brasília (DF); 2019.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010 – **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília, 2010.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, London, v. 93, p. 223-226, 2005.

CHANG, S. T.; WANG, D. S. Y.; WU, C. L.; SHIAH, S. G.; KUO, Y. H.; CHANG, C. J. Cytotoxicity of extractives from *Taiwania cryptomerioides* heartwood. **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 227-232, 2000.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products: mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, n. 1, p. 540-560, 2017.

COSTA, A.F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, p. 1032, 1982.

CUCA-SUAREZ, L. E.; DELLA-MONACHE, F.; COY-BARRERA, E. Cytotoxic constituents from bark and leaves of *Amyris pinnata* Kunth. **Records of Natural products**, v. 9, n. 3, p. 441-445, 2015.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. Visão acadêmica. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n., p. 809-812, 1978.

HAMDY, S.A., HEFNAWY, H.M., AZZAM, S.M., ABOUTABL, E. A. Chemical profiling, volatile oil analysis and anticholinesterase activity of *Hycrocotyle umbellate* L. aerial parts cultivated in Egypt. **South Afr. J. Bot.** 115, 108-112, 2018.

IMEH. U.; KHOKHAR. S. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 6.301-6.306, 2002.

JEONG, E. J.; HWANG, L.; LEE, M.; LEE, K. Y.; AHN, M. J.; SUNG, S. H. Neuroprotective biflavonoids of *Chamaecyparis obtusa* leaves against glutamate-induced oxidative stress in HT22 hippocampal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 397-402, 2014.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2009.

JUNG, H. J.; JUNG, H. A.; MIN, B. S.; CHOI, J. S. Anticholinesterase and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibitory compounds from the heartwood of *Juniperus chinensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.63, n. 1, p.955-960, 2015.

LEE, S.; YOO, H. H.; PIAO, X. L.; KIM, J. S.; KANG, S. S.; SHIN, K. H. Anti-estrogenic activity of lignans from *Acanthopanax chiisanensis* root. Archives of **Pharmacy Research**, v. 28, n. 2, p. 186-189, 2005.

LIM, H. S.; OH, S. R.; LEE, H. J.; CHIN, Y. W.; AHN, K. S.; SOK, D. E.; LEE, H. K. Suppressive effects of *Anthriscus sylvestris* constituents on the expression and production of matrix metalloproteinase-9 using luciferase transfected raw 264.7 cell based assay system. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 620-625, 2009.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoides – a review. **Biomed Pharmacother**. v. 56, p. 296-301, 2002.

MANSOOR, T. A.; BORRALHO, P. M.; LUO, X.; MULHOVO, S.; RODRIGUES, C. M. P.; FERREIRA, M. J. U. Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells. **Phytomedicine**, v.20, n. 1, p. 923-929, 2013.

MATSUBARA, H. Studies on synergist for insecticides. (XXVII): on the synergistic effect of several lignans on pyrethrins and allethrin. **Bulletin of the Institute for Chemical Research**, v.50, n. 3, p. 197-205, 1972.

MOUSINHO MC, Oliveira F. **Identificação de alcalóides xantícos do guaraná (*Paulinnia cupana* KBH) por cromatografia em camada delgada em amostra de urina**. Rev Bras Farmacognosia 1: 35-44,1986.

OLIVEIRA M.G.; ALMEIDA P.H.G.; OLIVEIRA T.L.S.; SILVA L.S.; CARVALHO F.S.; ALVES S.F.; BORGES L.L.; SANTOS P.A.; SILVA V.B.; PAULA J.R. HPLC-PDA method validated for the determination of hibalactone in *Hydrocotyle umbellata* L. (Araliaceae) subterraneous parts and its ultrasound-assisted extraction optimization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2019.

OLIVEIRA, T. L. S.; MORAIS, S. R.; SÁ, S.; OLIVEIRA, M. G.; FLORENTINO, I. F.; SILVA, D. M.; CARVALHO, V. V.; SILVA, V. B.; VAZ, B. G.; SABINO, J. R.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract, fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acaríçoba) – Araliaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, n. 1, p. 837- 846, 2017.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADOSANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation Assay for Total Flavonoids, as Rutin Equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olachoides* Benth (Olacaceae) commercial extracts. **Journal of AOC International**. v. 88, n. 4, p. 1015–1019, 2005.

SANTANA, S. A. **Estudo farmacognóstico da acariçoba, *Hydrocotyle umbellata* L. Apiaceae**. 2001. 117f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, Y. L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.

African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 50-55, 2008.

SOUSA, J. N.; PEDROSO, N. B.; BORGES, L. L., OLIVEIRA, G. A. R.; PAULA, J. R.; CONCEIÇÃO, E. C. Optimization of Ultrasound-assisted extraction of polyphenols, tannins and epigallocatechin gallate from barks of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville bark extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, n. 38, p. 318-323, 2014.

STICHER, O. Quality of ginkgo preparations. **Planta Med**, v. 59, p. 2-11, 1993.

WANG FM.; YAO TW.; ZENG, S. Disposition of quercetin and kaempferol in human following an oral administration of Ginkgo biloba extract tablets. **Eur J Drug Metab Ph**, v. 28, p. 173-177, 2003.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, n., p. 137-147, 1987.

WHO. Quality control methods for herbal materials. **World Health Organization**. 2011. (Geneve).

YOON, J. S.; KOO, K. A.; MA, C. J.; SUNG, S. H.; KIM, Y. C. Neuroprotective lignans from *Biota orientalis* leaves. **Natural Product Science**, v.14, n. 3, p.167-170, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. **Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 6, 1421-1428, 2010.