



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO MICROQUÍMICO E
ANATÔMICO DA CASCA E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell.
Arg.) Woodson**

Patricia Miriam Sayuri Sato Barros

BELÉM-PA

2010

| | | | |
|------------------------|---|--|---------------------------|
| BARROS, P. M. S. S. | CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO MICROQUÍMICO E ANATÔMICO DA CASCA E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES TOTAIS DE <i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson | | PPGCF ICS/UFPA 2010 |
|------------------------|---|--|---------------------------|

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO MICROQUÍMICO E
ANATÔMICO DA CASCA E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell.
Arg.) Woodson**

Autor: Patricia Miriam Sayuri Sato Barros

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Co-orientador: Dr^a. Fernanda Ilkiu Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UFPA, Belém-PA

Barros, Patricia Miriam Sayuri Sato, 1979 -
Contribuição para o estudo microquímico e anatômico da casca e
validação de um método espectrofotométrico para quantificação de
alcalóides totais de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson / Patricia
Miriam Sayuri Sato Barros ; orientador, Wagner Luiz Ramos Barbosa; co-
orientador, Fernanda Ilkiu Borges. — 2010

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêutica, Belém, 2010.

1. Apocynaceae. 2. Matéria médica vegetal. 3. Controle de
qualidade. I. Título.

CDD - 22. ED. 615.32393

FOLHA DE APROVAÇÃO

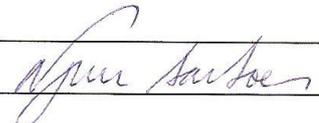
Patricia Miriam Sayuri Sato Barros

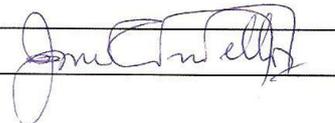
Contribuição para o estudo microquímico e anatômico da casca e validação de um método espectrofotométrico para quantificação de alcalóides totais de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Trabalho defendido e aprovado em: 22/01/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Instituição: UFPA Assinatura: 

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Instituição: UEM Assinatura: 

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Jr.
Instituição: UFPA Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Ao Marconi, meu marido, pelo apoio, compreensão, dedicação e amor que completa e enriquece a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e por permitir mais esta realização em minha vida.

Ao meu marido pelo amor e apoio que me concede todos os dias.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e incentivo que sempre me dedicaram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa pela orientação concedida e confiança depositada.

À minha amiga Nádia pelo companheirismo e contribuição no laboratório.

À Dr^a Fernanda Ilkiu Borges da EMBRAPA pela atenção e conhecimentos compartilhados o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela valiosa discussão e revisão da dissertação.

Ao Dr. Joaquim Ivanir Gomes da EMBRAPA pela atenção e auxílio prestados.

Ao Edilson, João e Miguel da EMBRAPA pela contribuição fundamental á realização deste trabalho.

Ao Prof. Titular Dr. Cid Aimbiré M. Santos da Universidade Federal do Paraná pela colaboração dada ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Kleyffson Alves de Miranda diretor do LACEN – PA pelo apoio, o que tornou possível a concretização desta realização pessoal.

Ao Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira pela atenção e conhecimentos dispensados.

Aos meus amigos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e do LACEN-PA pelo companheirismo, apoio e amizade.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros e profundos agradecimentos.

“Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

BARROS, P. M. S. S. Contribuição para o estudo microquímico e anatômico da casca e validação de um método espectrofotométrico para quantificação de alcalóides totais de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

Para o registro de fitoterápicos e disponibilização deles para os usuários, a ANVISA estabelece parâmetros de eficácia, qualidade e segurança e, estipula requisitos de controle semelhantes àqueles aplicados aos medicamentos sintéticos. Este trabalho relata a investigação da casca de *Himatanthus lancifolius* e seus extratos, a fim de contribuir para a padronização dos derivados desta espécie vegetal; os ensaios foram desenvolvidos utilizando amostras comerciais Q e S e uma autêntica, E, fornecida pela EMBRAPA. A comparação microquímica, anatômica e cromatográfica de Q, S e E não permite que se caracterizem as amostras comerciais como *H. lancifolius*. A presença de uleína não pôde ser caracterizada em qualquer amostra, mesmo em E. Os dados de CCD e CLAE mostram que as três amostras têm perfil cromatográfico diferente. As características morfológicas e a caracterização microquímica das cascas de *H. lancifolius* mostram córtex com grupos de fibras do floema primário inclusos, com cristais e lactíferos na região do floema secundário, e positividade para alcalóides, flavonóides, açúcares redutores e amido. O método de quantificação desenvolvido mostra alta seletividade a 281nm, o que confere confiança para a detecção dos alcalóides. O método é robusto, de acordo com o regulamento em vigor e mostra linearidade, precisão e robustez, ao lado da acessibilidade, sendo ainda de fácil execução. A fração de alcalóides totais do extrato aquoso da amostra coletada (E) representa 0,219% do extrato seco. Espera-se com este trabalho ter contribuído para reduzir a insuficiência de métodos de controle da qualidade para fitoterápicos preparados a partir de *Himatanthus lancifolius*.

Palavras-chave: Validação; *Himatanthus lancifolius*; fitoterápicos; controle de qualidade; Apocynaceae.

ABSTRACT

BARROS, P.M.S.S. Contribution to the microchemical and anatomical study of the bark and validation of a espectrophotometric method for the total alkaloid quantification of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson. 2010. Master Degree Dissertation - Pharmacy Faculty, Federal University of Pará, Belém, 2010.

For the registration of phytomedicines and their availability to the users, ANVISA establishes quality, security and effectiveness parameters, stipulating control requirements similar to that ones applied to synthetic medicines. This work reports the investigation of the bark of *Himatanthus lancifolius* and its extracts aiming to contribute for the standardization of derivatives of this plant species, the assays were developed using commercial samples Q and S, and an authentic one provided by EMBRAPA – E. The microchemical, anatomical and chromatographic comparison of Q, S and E does not allow characterising both the commercial sample as *H. lancifolius*. The presence of ulein could not be characterised in any sample, even in E. The TLC and HPLC data show that the three samples have different chromatographic profile. The morphological and the microchemical characterisation of the barks of *H. lancifolius* shows cortex with groups of fibres of the primary phloem included, with crystals and lactifers in the region of the secondary phloem. The developed quantification method shows high selectivity at 281nm, what confers confidence for the detection of the alkaloids. The method is robust, according to the current regulation, and shows linearity, precision and accuracy, beside accessibility and is easy to execute. The total alkaloid fraction present in the aqueous extract of the collected sample (E) represents 0,219% of the dried extract. The author expects to have contributed for reducing the lack of methods for the quality control of phytomedicines from *Himatanthus lancifolius*.

Word-key: Validation; *Himatanthus lancifolius*; fitoterapics; quality control; Apocynaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Aspectos morfológicos de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson. Aspecto geral (A): tronco de *H. lancifolius* de onde foi retirada amostra da casca, (B e C): Folhas, (D): casca fresca, (E): casca seca e (F, G, H, I): grãos de pólen..... 30
- Figura 2 Uleína (A) e demetoxiaspidospermina (B) (França, et al., 2000). 31
- Figura 3 Ioimbina e Uleína com destaque para o núcleo indólico..... 32
- Figura 4 Seção transversal da casca de *Himatanthus lancifolius*. Corada com safranina e observada em microscópio com aumento de 10X. Gupos de fibras do floema primário (➡), raio (⇨). CL: Canais Lactíferos; GCP: Grupo de Células Pétreas; PF: Periciclo fibroso..... 59
- Figura 5 Detalhe de fibras não lignificadas em grupos no periciclo. Seção transversal da casca de *H. lancifolius* corado com safranina e observado em microscópio com aumento de 10X.... 60
- Figura 6 Detalhe dos raios da casca de *Himatanthus lancifolius*. A: Seção longitudinal radial; B: Seção longitudinal tangencial. Cortes corados com safranina e observados em microscópio com aumento de 10X. CF: Células Fusiformes; FF: Feixe de Fibras; RMS: Raio Medular Secundário..... 60
- Figura 7 Destaque para os cristais da casca de *Himatanthus lancifolius*. A: Seção longitudinal tangencial observada com aumento de 10X. B: Seção longitudinal tangencial observada com aumento de 40X. Corados com azul de astra e safranina. C: Cristais; RMS: Raio Medular Secundário..... 60

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 8 | Destaque para testes microquímicos em <i>Himatanthus lancifolius</i> | 62 |
| Figura 9 | Gráfico da distribuição granulométrica do pó das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i> , destaque para o diâmetro médio das partículas do pó ~280µm..... | 63 |
| Figura 10 | Teste com reativo de Dragendorff em placa escavada..... | 64 |
| Figura 11 | Cromatograma em camada delgada da fração alcaloídica dos extratos etanólicos de Q, S, E e Uleína (U) com Dragendorff. Eluente: hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2 v/v)..... | 67 |
| Figura 12 | Cromatograma em camada delgada das frações obtidas por CCD preparativa comparadas com a fração alcaloídica original E (6), uleína (7) e ioimbina (8) revelado com Dragendorff. Eluente: hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2 v/v) | 68 |
| Figura 13 | Cromatograma de alta eficiência mostrando a análise comparativa das frações alcaloídicas do extrato etanólico de E e Q..... | 69 |
| Figura 14 | Cromatograma de alta eficiência da uleína registrado a 250nm observando-se uma absorção máxima (~0,16 AU) no tempo de retenção 16,11min..... | 70 |
| Figura 15 | Cromatograma de alta eficiência da fração alcaloídica do extrato aquoso de E registrado a 250nm onde se observam absorções máximas a 10,53min e 16,32min..... | 70 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 16 | Cromatograma de alta eficiência da fração alcaloídica do extrato etanólico de E registrado a 250nm onde se observam absorções máximas a 11,57min e 16,61min..... | 71 |
| Figura 17 | Sobreposição dos espectros dos picos de tempo de retenção 16,11min da uleína (—) e da fração alcaloídica dos extratos: 16,61min do (—) etanólico (A) e 16,32min do aquoso(B) da amostra E..... | 71 |
| Figura 18 | Cromatograma de alta eficiência, a 250nm, da ioimbina observando-se a absorção máxima a 11,87min..... | 72 |
| Figura 19 | Sobreposição dos espectros dos picos de tempo de retenção,11,87min da ioimbina (—) e da fração alcaloídica dos extratos: 11,57min do (—) etanólico (A) e 10,53min do aquoso(B) da amostra E | 72 |
| Figura 20 | Comparação dos cromatogramas de alta eficiência a 250nm das frações 1(a), 2 (b), 3 (c), 4(d) e 5(e) obtidas por CCD preparativa, com a uleína (f) e a ioimbina (g)..... | 73 |
| Figura 21 | Cromatograma de alta eficiência, a 250nm, da fração 2 obtida por CCD preparativa onde se observam as absorções máximas a 11,76min e 15,73min..... | 74 |
| Figura 22 | Espectro de UV obtido para a fração alcaloídica do extrato aquoso (—) e para o cloridrato de ioimbina (—) evidenciando os máximos de absorção e suas respectivas absortividades. Nota-se a absorção máxima a 281nm para ambas as amostras..... | 75 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 23 | Seletividade do método desenvolvido com ioimbina, como referência, 22µg/mL (—), em relação à fração alcaloídica do extrato aquoso de <i>H. lancifolius</i> a 30 µg/mL (—) e ao solvente metanol (—); em varredura de 200nm a 400nm (A) e em detalhe de 240nm a 300nm (B)..... | 76 |
| Figura 24 | Representação gráfica da linearidade do método para as soluções de referência com ioimbina a 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 µg/mL..... | 77 |
| Figura 25 | Representação gráfica dos resíduos da linearidade do método para as soluções de referência com ioimbina a 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 µg/mL..... | 78 |
| Figura 26 | Representação gráfica da curva de calibração obtida com soluções de ioimbina a 18, 22, 24, 26 e 28µg/mL..... | 79 |
| Figura 27 | Representação da robustez do método pelo espectro de UV da ioimbina a 16µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes..... | 82 |
| Figura 28 | Representação da robustez do método pelo espectro de UV da ioimbina a 20µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes..... | 82 |
| Figura 29 | Representação da robustez do método pelo espectro de UV da ioimbina a 28µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes..... | 83 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Esquema 1 | Esquema geral da obtenção dos extratos e frações..... | 44 |
|-----------|---|----|

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Enquadramento taxonômico de <i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson..... | 28 |
| Quadro 2 | Classificação dos testes segundo sua finalidade..... | 33 |
| Quadro 3 | Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade..... | 34 |
| Quadro 4 | Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez..... | 34 |
| Quadro 5 | Resultado da abordagem fitoquímica dos extratos etanólicos das cascas de <i>H. lancifolius</i> , amostras Q, S e E..... | 64 |
| Quadro 6 | Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos aquosos das cascas de <i>H. lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, amostras Q e E..... | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Rendimento da extração etanólica e aquosa..... | 66 |
| Tabela 2 | Rendimento da obtenção frações alcalóidicas dos extratos ácido, etanólico e aquoso..... | 66 |
| Tabela 3 | Resultados do teste de linearidade do método desenvolvido por espectrofotometria no UV utilizando-se soluções de ioimbina como referência..... | 77 |
| Tabela 4 | Resultados da curva de calibração obtida por espectrofotometria no UV utilizando-se soluções de ioimbina como referência..... | 79 |
| Tabela 5 | Resultados da verificação de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método espectrofotométrico no UV desenvolvido para o doseamento de alcalóides totais contidos no extrato aquoso de <i>H. lancifolius</i> | 80 |
| Tabela 6 | Resultados da avaliação da robustez do método espectrofotométrico no UV desenvolvido para o doseamento de alcalóides totais contidos no extrato aquoso de <i>H. lancifolius</i> | 81 |
| Tabela 7 | Rendimento em alcalóides totais relativo ao pó da casca de <i>H. lancifolius</i> empregado para preparação do extrato aquoso seco (I), em relação ao extrato aquoso seco (II) e em relação a fração alcalóidica obtida (III)..... | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| INPM | Instituto Nacional de Pesos e Medidas |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PNPIC | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares |
| PTFE | Politetra-fluoretileno |
| RE | Resolução |
| R _f | Fator de Retenção |
| RT | Tempo de Retenção |
| SQR | Substância Química de Referência |
| UFPA | Universidade Federal do Pará |
| UV | Ultravioleta |
| UV-VIS | Ultravioleta - Visível |

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

(De acordo com as normas do programa)

| | |
|-----|---------------|
| °C | Graus Celsius |
| cm | Centímetro |
| g | Grama |
| GL | Gay Lussac |
| h | Hora |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| nm | Nanômetro |
| v/v | Volume/Volume |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 | CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 24 |
| 2.1 | Fitoterápicos no Brasil..... | 25 |
| 2.2 | Problema da qualidade dos fitoterápicos e da matéria-prima vegetal..... | 26 |
| 2.3 | Diferenciação entre o gênero <i>Plumeria</i> e <i>Himatanthus</i> | 27 |
| 2.4 | Enquadramento taxonômico de <i>Himatanthus lancifolius</i> | 28 |
| 2.5 | Aspectos botânicos de <i>H. lancifolius</i> | 29 |
| 2.6 | Uso de <i>Himatanthus lancifolius</i> como planta medicinal..... | 31 |
| 2.7 | Alcalóides presentes nas cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i> | 32 |
| 2.8 | Procedimentos para a validação de métodos..... | 32 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 36 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 36 |
| 4 | MATERIAIS..... | 37 |
| 4.1 | Material vegetal..... | 38 |
| 4.2 | Substâncias puras..... | 38 |
| 4.3 | Solventes e reagentes..... | 38 |
| 4.4 | Suporte cromatográfico..... | 39 |
| 4.5 | Equipamentos..... | 39 |
| 5 | MÉTODOS..... | 40 |
| 5.1 | Tratamento do material vegetal..... | 41 |
| 5.2 | Preparo do material vegetal para testes microquímicos e caracterização anatômica..... | 41 |
| 5.3 | Montagem das lâminas para caracterização anatômica..... | 41 |
| 5.4 | Montagem das lâminas para os testes microquímicos..... | 42 |
| 5.5 | Testes microquímicos..... | 42 |
| 5.5.1 | ALCALÓIDES..... | 42 |
| 5.5.2 | FLAVONÓIDES..... | 42 |
| 5.5.3 | ANTRAQUINONAS..... | 43 |
| 5.5.4 | COMPOSTOS FENÓLICOS..... | 43 |
| 5.5.5 | AÇÚCARES REDUTORES..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5.6 AMIDO..... | 44 |
| 5.6 Determinação da distribuição granulométrica do pó das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i>..... | 44 |
| 5.7 Obtenção dos extratos e das frações..... | 44 |
| 5.7.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ÁCIDO..... | 45 |
| 5.7.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO..... | 45 |
| 5.7.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO..... | 45 |
| 5.7.4 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALÓIDICA | 45 |
| 5.8 Cálculo do rendimento das extrações e dos fracionamentos..... | 46 |
| 5.9 Prospecção fitoquímica..... | 47 |
| 5.9.1 DOS EXTRATOS ÁCIDOS..... | 47 |
| 5.9.2 DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E AQUOSOS..... | 47 |
| 5.9.2.1 Saponinas..... | 47 |
| 5.9.2.2 Açúcares redutores..... | 48 |
| 5.9.2.3 Polissacarídeos..... | 48 |
| 5.9.2.4 Fenóis e taninos..... | 48 |
| 5.9.2.5 Glicosídeos cardiotônicos..... | 49 |
| 5.9.2.6 Flavonóides..... | 49 |
| 5.9.2.7 Alcalóides..... | 49 |
| 5.9.2.8 Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas..... | 49 |
| 5.9.2.9 Sesquiterpenolactonas e outras lactonas..... | 50 |
| 5.9.2.10 Proteínas e aminoácidos..... | 50 |
| 5.9.2.11 Catequinas..... | 50 |
| 5.9.2.12 Purinas..... | 50 |
| 5.10 Análise dos extratos e frações por cromatografia de camada delgada (CCD)..... | 51 |
| 5.11 Obtenção de frações por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP)..... | 51 |
| 5.12 Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 52 |
| 5.12.1 PREPARO DAS AMOSTRAS..... | 52 |
| 5.12.2 PROGRAMAÇÃO DE ANÁLISE..... | 52 |
| 5.13 Validação do método espectrofotométrico para a quantificação de alcalóides totais..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 5.13.1 AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA..... | 53 |
| 5.13.2 PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO..... | 53 |
| 5.13.2.1 Seletividade..... | 53 |
| 5.13.2.2 Linearidade..... | 53 |
| 5.13.2.3 Intervalo..... | 54 |
| 5.13.2.4 Curva de calibração..... | 54 |
| 4.13.2.5 Precisão..... | 54 |
| 5.13.2.6 Exatidão..... | 55 |
| 5.13.2.7 Limite de detecção..... | 55 |
| 5.13.2.8 Limite de quantificação..... | 56 |
| 5.13.2.9 Robustez..... | 56 |
| 5.14 Quantificação dos alcalóides totais presentes no extrato aquoso de <i>Himatanthus lancifolius</i>..... | 56 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 57 |
| 6.1 Caracterização anatômica das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i>..... | 58 |
| 6.2 Testes microquímicos com as cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i>..... | 61 |
| 6.3 Determinação da distribuição granulométrica do pó das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i>..... | 63 |
| 6.4 Prospecção fitoquímica..... | 63 |
| 6.5 Obtenção dos extratos e das frações..... | 65 |
| 6.6 Rendimento das extrações e dos fracionamentos..... | 66 |
| 6.7 Cromatografia de camada delgada..... | 67 |
| 6.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 68 |
| 6.9 Validação de método espectrofotométrico para a quantificação dos alcalóides totais..... | 75 |
| 6.9.1 CRITÉRIOS PARA VALIDAÇÃO..... | 76 |
| 6.9.1.1 Seletividade..... | 76 |
| 6.9.1.2 Linearidade..... | 77 |
| 6.9.1.3 Intervalo..... | 78 |
| 6.9.1.4 Curva de calibração..... | 79 |
| 6.9.1.5 Precisão e exatidão..... | 80 |
| 6.9.1.6 Limite de detecção..... | 80 |
| 6.9.1.7 Limite de quantificação..... | 81 |
| 6.9.1.8 Robustez..... | 81 |

| | |
|---|----|
| 6.10 Quantificação dos alcalóides totais presentes no extrato aquoso de <i>Himatanthus lancifolius</i> | 83 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 85 |
| REFERÊNCIAS | 87 |

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo planta medicinal foi definido durante a 31ª assembléia da Organização Mundial da Saúde (OMS) como “aquela que administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica” sendo, na ocasião, oficialmente reconhecido (DAVID, 2004). Considerando essa definição e a finalidade da sua utilização, bem como a forma do uso das plantas medicinais David e David (2002) classificaram-nas como aquelas destinadas: 1- à obtenção de substâncias puras; 2- à produção de fitoterápicos; 3- à utilização na medicina caseira.

Houve nos últimos anos um interesse crescente pelo uso de terapias complementares e produtos naturais como recurso terapêutico, especialmente drogas vegetais, o que pode estar relacionado a diversos fatores, entre eles: os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos; o fato de amplas camadas da população mundial não terem acesso a medicamentos e à medicina institucionalizada; à consciência ecológica e à crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

O principal órgão responsável pela regulamentação da utilização de plantas medicinais e seus derivados no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tem como função proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (BRASIL, 1999).

Este controle visa desconstruir a idéia de que fitoterápicos sejam produtos de qualidade inferior ou sem potencial de risco tóxico, pois avalia diversos parâmetros de qualidade, segurança e eficácia, exigindo requisitos similares aos requeridos para os medicamentos sintéticos (CARVALHO, 2007).

Entre as plantas medicinais e fitoterápicos utilizados no Brasil estão os derivados de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, popularmente conhecida como agoniada, indicados para o tratamento de problemas menstruais e até como abortivo (CRUZ, 1985; MENGUE, 1997).

No intuito de se garantir maior eficácia e segurança de tratamento aos usuários de produtos fitoterápicos, produzindo os critérios de qualidade exigidos pela ANVISA, estudos de padronização do extrato da casca de *H. lancifolius* com métodos validados se fazem necessários.

Para este fim desenvolveu-se a caracterização da matéria-prima vegetal e a investigação fitoquímica de derivados de *H. lancifolius* que resultou em um método validado para a padronização desses derivados, atendendo à regulamentação vigente, com isso contribuindo para a garantia da qualidade de produtos a base desta planta.

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 Fitoterápicos no Brasil

Os fitoterápicos movimentam mundialmente aproximadamente 22 bilhões de dólares e estima-se que no Brasil esse mercado gire em torno de 160 milhões por ano tendo como fator de atração o crescimento das vendas internas que representa mais de 15% anuais contra apenas 5% para os medicamentos sintéticos (YUNES, 2001; CARVALHO, 2008).

Vale ressaltar que a OMS vem estimulando o uso de práticas terapêuticas integrativas e complementares nos sistemas de saúde de forma integrada às técnicas da medicina ocidental e que preconiza o desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso.

Marcos regulatórios como a RDC nº 48 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2004, que é a principal legislação atual que regulamenta o registro de fitoterápicos, e o decreto nº 5.813 de 2006 o qual instaura a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” têm sido instituídos no sentido de orientar e incentivar a utilização destas drogas vegetais com segurança.

A RDC nº48/2004 da ANVISA define medicamento fitoterápico aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade, não considerando medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Levando-se em conta que a fitoterapia é uma prática terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas e que é amplamente utilizada pela população (PINTO, 2009), instituiu-se a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) a qual recomenda a adoção pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios a implantação de ações e serviços relativos às práticas integrativas e

complementares, entre elas o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006).

O processamento farmacotécnico de plantas para obtenção de um medicamento resulta nos conhecidos medicamentos fitoterápicos, que uma vez industrializados devem ser registrados na ANVISA, órgão federal do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, a fim de se poder garantir segurança, eficácia e qualidade comprovada para a população, padronizando-se a quantidade e a forma certa que devem ser usados (CARVALHO, 2007).

Uma das exigências a serem cumpridas, de acordo com a resolução da ANVISA, é a descrição detalhada de todos os procedimentos utilizados na produção do medicamento e no controle de sua qualidade, com base em métodos analíticos devidamente validados; de acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos apresentados na RE nº 899/2003. Deve-se indicar a fonte bibliográfica ou descrever o desenvolvimento do método sempre que não haja compêndios oficiais que contenham o tratamento da matéria-prima em questão.

2.2 Problema da qualidade dos fitoterápicos e da matéria-prima vegetal

A qualidade das formulações farmacêuticas está intimamente ligada à qualidade da matéria-prima e, com relação aos fitoterápicos, os problemas mais freqüentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações. A falta de padronização da matéria-prima vegetal quanto à constituição química é um fator importante a ser considerado a fim de garantir a uniformidade do produto final (FARIAS, 1985).

Se a espécie vegetal escolhida for encontrada em diferentes regiões do país, torna-se importante avaliar as modificações químicas que possam ocorrer em decorrência de fatores ambientais, idade da planta e época da coleta (MACIEL, 2002). Estudos comprovam que o metabolismo secundário das plantas pode variar consideravelmente dependendo de fatores como: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e até indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. (GOBBO-NETO, 2007)

A origem e a qualidade das matérias-primas vegetais são fundamentais para a obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis, possuindo papel central no processo de controle de qualidade e padronização dos fitoterápicos. (GOBBO-NETO, 2007)

Uma vez definida a espécie vegetal que se deseja trabalhar alguns cuidados são necessários para a aquisição da matéria-prima vegetal, tal como a correta identificação botânica já que os nomes populares das plantas são muitas vezes regionais, variando de um lugar para o outro, além disso, é comum diferentes espécies apresentarem a mesma denominação regional ou uma única espécie ter diferentes denominações populares, ademais algumas espécies são morfologicamente semelhantes e, dependendo da época da coleta, torna-se muito difícil a inequívoca distinção entre elas; não sendo raros os casos de intoxicações devido à identificação incorreta da espécie vegetal (FARIAS, 1985; MENGUE, 2001).

O controle da comercialização de plantas medicinais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, feito pelos órgãos oficiais no Brasil, ainda é insuficiente e erros de identificação cometidos por comerciantes e/ou fornecedores podem ocorrer (VEIGA JR, 2005).

2.3 Diferenciação entre o gênero *Plumeria* e *Himatanthus*

O gênero *Himatanthus* foi descrito por Willdenow baseado na espécie *Himatanthus rigidus* coletada no Pará. Em 1819 Schultes validou esses nomes e estabeleceu o gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. e a espécie *Himatanthus rigidus* Willd. ex Schult. na obra *Systema Vegetabilium* (SPINA, 2004).

Em 1860 Mueller-Argoviensis não considerou a descrição do gênero *Himatanthus* e da espécie *H. rigidus* coletada no Pará e classificou erroneamente o gênero como *Plumeria*; erro este que foi repetido por K. Schumann em 1895, apesar de o termo *Himatanthus* Willd. já ter sido proposto no sistema de Roemer & Schultes em 1819 com descrições genéricas e específicas satisfatórias (WOODSON, 1938; SPINA, 2004).

O termo *Plumeria* foi utilizado erroneamente no lugar de *Himatanthus* até 1938 quando Robert E. Woodson Jr. em seu trabalho denominado "Studies in the Apocynaceae: An Evaluation of the Genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd.", que

desenvolveu para o Missouri Botanical Garden, observou que as espécies indígenas da América do Sul eram diferentes morfológicamente das espécies da América Central e do Norte.

Em 1938 Woodson deixou evidente a diferença entre os dois gêneros com base em caracteres morfológicos de órgãos reprodutores, no caso flores, considerados na botânica taxonômica determinantes para a caracterização definitiva de famílias, gêneros e espécies vegetais (SPINA, 2004).

2.4 Enquadramento taxonômico de *Himatanthus lancifolius*

O enquadramento taxonômico segundo Cronquist (1988 apud SOUZA, 2008) encontra-se no Quadro 1.

| | |
|-----------|---|
| Divisão | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Subclasse | Asteridae |
| Ordem | Gentianales |
| Família | Apocynaceae |
| Gênero | <i>Himatanthus</i> |
| Espécie | <i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson* |

Quadro 1 - Enquadramento taxonômico de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson

Apesar de se ter o enquadramento taxonômico definido, em 2004 foi proposta por Spina uma revisão taxonômica do gênero *Himatanthus*, a fim de resolver problemas, segundo a autora, quanto à tipificação das espécies e à validade das categorias taxonômicas propostas nos trabalhos de Woodson (1938) e Plumel (1990, 1991). No trabalho intitulado “Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae – Plumerieae)” Spina (2004) propõe que *H. lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson seria

* Basionimo: *Plumeria lancifolia* (Muell. Arg.)

sinônimo de *H. bracteatus* (A. DC.) Woodson evidenciando que ainda há polêmica quanto à diferenciação da espécie em questão.

2.5 Aspectos botânicos de *H. lancifolius*

O gênero *Himatanthus*, nome derivado do grego que significa “manto floral”, em referência às brácteas que envolvem os botões florais, foi descrito por Carl Willdenow e Josef Schultes e compreende apenas 13 espécies, todas encontradas na América do Sul, principalmente na Amazônia. Esse gênero, que foi previamente considerado um sinônimo de *Plumeria*, foi discutido em trabalhos, os quais permitiram a clara distinção entre ambos. (AMARAL et al., 2007)

A espécie-tipo pertence à família das Apocynaceae e juntamente com algumas variedades ocorre desde o Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás e na Amazônia (CORRÊA, 1984).

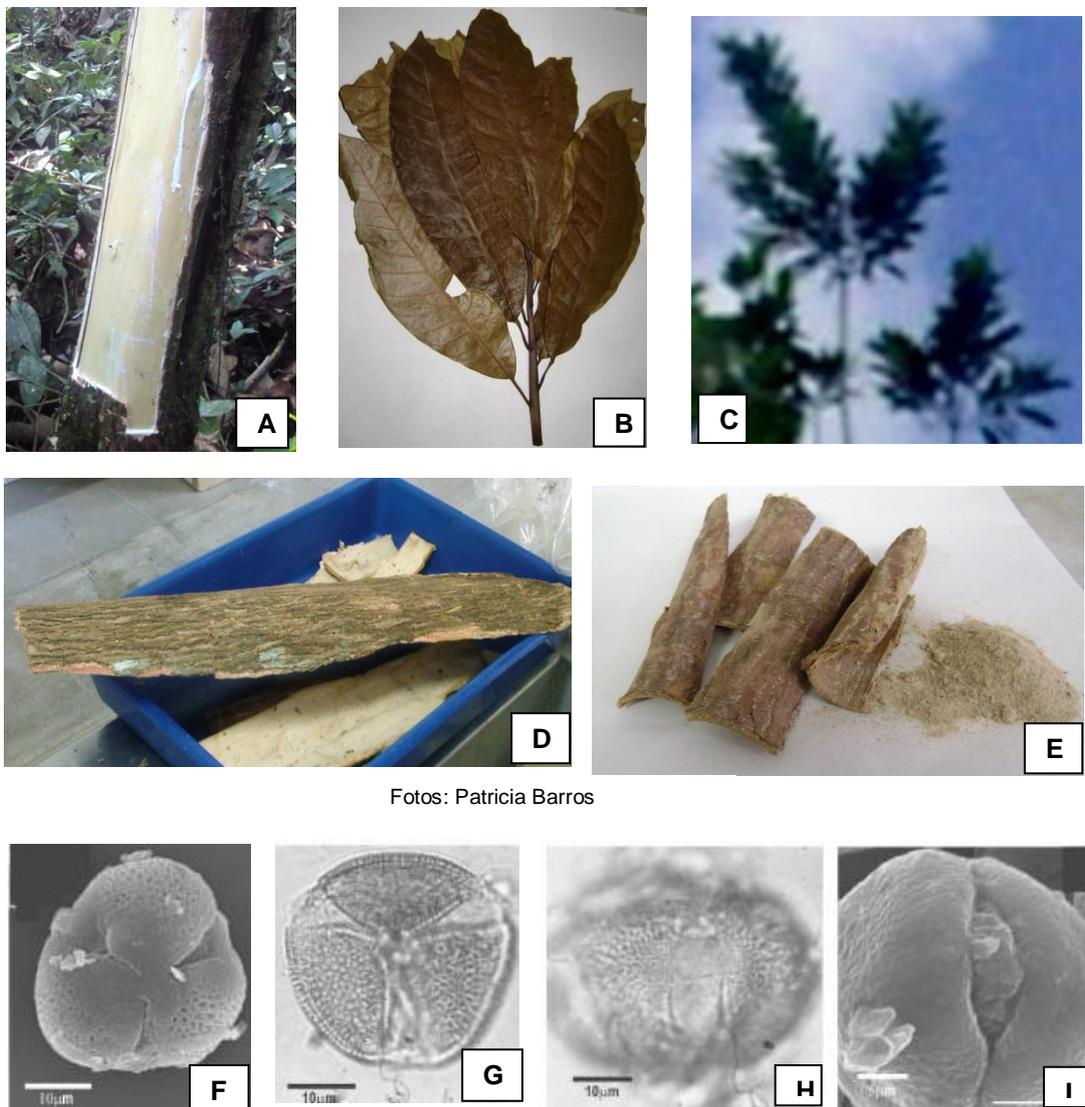
As Apocynaceae compreendem cerca de 450 gêneros e 4.950 espécies com distribuição pantropical. No Brasil, são representadas por três subfamílias: Asclepiadoideae, Rauvolfioideae e Apocynoideae (ENDRESS e BRUYNS, 2000), ocorrendo em ambientes campestres e florestais com cerca de 60 gêneros e 750 espécies (GIULIETTI et al., 2005). A presença de látex nos órgãos reprodutivos e vegetativos (Fig. 1A) e flores com prefloração contorta são características marcantes das Apocynaceae (CRONQUIST, 1988, apud SOUZA, 2008).

O gênero *Himatanthus* pertence à subfamília Rauvolfioideae (MATOZINHOS, 2008) e caracteriza-se por ser arbusto ou árvore pequena de até 8 m de altura com casca acizentada, folhas longo-grosso-pecioladas, opostas, lanceoladas, inteiras, agudas, glabras com até 25 cm de comprimento e 3 cm de largura (Fig. 1- B e C). As flores são brancas campanuladas, com a base do tubo amarelada, dispostas nos ápices dos ramos em cimeiras de 2-3 ou mais, apresentam frutos folículo geminados, fusiformes de 9 cm, contendo as sementes (CORRÊA, 1984).

As cascas, à medida que vão secando, vão se enroscando depois de destacadas da árvore (CRUZ, 1985), apresentam-se em pedaços de forma irregular, enroladas quase sempre em cilindros de 1 a 1,5 cm de diâmetro, ou tendo somente os bordos recurvados. A sua espessura varia de 1 a 6 mm conforme sejam provenientes dos ramos ou do tronco. As provenientes do tronco têm a

camada suberosa muito mais desenvolvida, de cor terrosa e coberta de placas esbranquiçadas de líquens, sua fratura é levemente fibrosa (Fig. 1D e E) (SILVA, 1926).

Os grãos de pólen são médios, isopolares, suboblatos a prolato-esferoidais com âmbito subtriangular e área polar pequena (Fig. 1- F e G). Os colpos são grandes, ficando o apocolpo limitado a uma região muito pequena, com endoabertura lalongada, ampla (Fig. 1- F, G, H, I) (MOREIRA, et al. 2004).



Fotos: Patricia Barros

Foto: Moreira, et al. 2004

Foto: Moreira, et al. 2004

Foto: Moreira, et al.2004

Foto: Moreira, et al.2004

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson. Aspecto geral (A): tronco de *H. lancifolius* de onde foi retirada amostra da casca, (B e C): Folhas, (D): casca fresca, (E): casca seca e (F, G, H, I): grãos de pólen.

2.6 Uso de *Himatanthus lancifolius* como planta medicinal

Himatanthus lancifolius popularmente conhecida como agoniada, quina mole, arapué ou tapuoca tem a sua casca comumente utilizada na forma de decocto para congestões uterinas, menstruações irregulares, difíceis e dolorosas, dores e cólicas uterinas, inflamações do útero e dos ovários, suspensão menstrual, no combate às tonteiras, perturbações do estômago, dores de cabeça, cansaço, desânimo, gases, prisão de ventre, “dores de cadeiras” que são conseqüentes das inflamações uterinas e para cessar rapidamente os corrimentos (CRUZ, 1985); e assim como outras plantas emenagogas há relatos de uso de *H. lancifolius* como abortivo (MENGUE, 1997).

O uso do chá de agoniada para o tratamento de problemas menstruais é bem difundido, inclusive pela internet onde podem ser encontrados vários sites indicando a ação terapêutica da planta incluindo sites organizacionais como o do Instituto Brasileiro de Qualidade e Gestão Pública ([HTTP://www.ibqgp.org.br/noticias.php?idNoticia=1700](http://www.ibqgp.org.br/noticias.php?idNoticia=1700)) o qual divulgou a notícia intitulada: “Tratamento natural para aliviar os sintomas de cólicas e TPM”, no qual cita a *H. lancifolius* como planta medicinal de largo uso no Brasil para aliviar sintomas menstruais.

No ano 2000, França et al., em estudos com os extratos da casca de *Plumeria lancifolia*, demonstraram a presença dos alcalóides indólicos uleína (Fig. 2 – A) e (+)-demetoxiaspidospermina (Fig. 2 – B) desde então seguiram-se outros trabalhos de pesquisa a respeito da atividade da uleína isolada de *H. lancifolius*, como a detecção da atividade gastroprotetora (BAGGIO et al., 2005), efeitos sobre a resposta da musculatura lisa vascular e não – vascular (RATTMANN, 2005), aumento na produção de óxido nítrico indicando efeito vasodilatador (SOUZA, 2007), além de um potencial antiinflamatório e imunomodulatório (NARDIN, 2006).

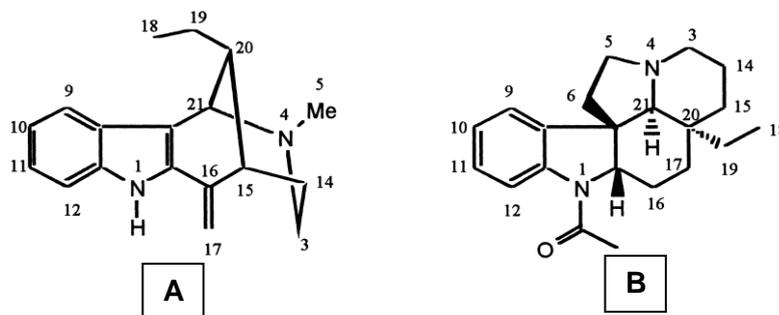


Figura 2 - Uleína (A) e demetoxiaspidospermina (B) (França, et al., 2000).

2.7 Alcalóides presentes nas cascas de *Himatanthus lancifolius*

Em 2008 foram isolados os alcalóides indólicos uleína e ioimbina das cascas de *H. lancifolius* (Figura 3), sendo relatada pela primeira vez a presença de ioimbina nesse gênero, os demais alcalóides presentes nessa espécie vegetal ainda não foram identificados; a ioimbina já havia sido isolada de espécies do gênero *Aspidosperma* e caracterizada por ultravioleta em metanol com máximos de absorção em 222nm, 281nm e 298nm (OLIVEIRA, 1994; LOPES, 2008).

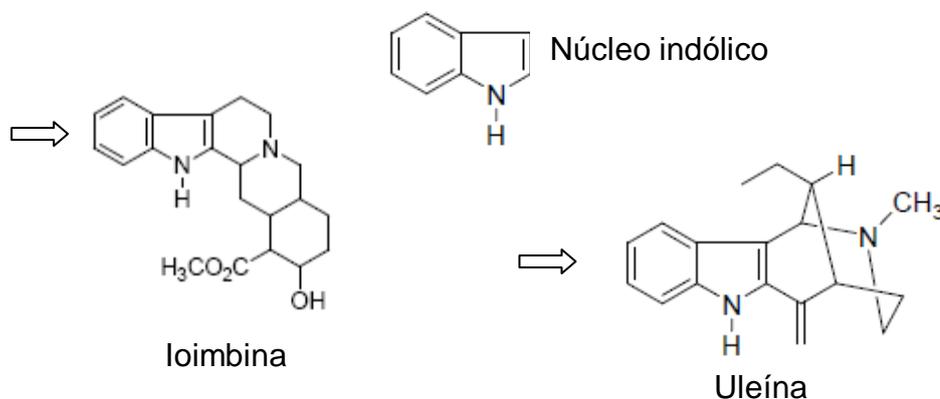


Figura 3 - Ioimbina e uleína com destaque para o núcleo indólico.

2.8 Procedimento para a validação de métodos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra analisada ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, et al. 2004). A validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC17025, 2001).

A validação tem o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica para registro de novos produtos (RIBANI, et al. 2004) No Brasil, há duas agências credenciadoras para 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 nº 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de junho de 2007.

Para o registro de fitoterápicos e a sua disponibilização à população a ANVISA estabelece e verifica diversos critérios de qualidade, segurança e eficácia, exigindo requisitos similares aos requeridos para os medicamentos sintéticos (CARVALHO, et al. 2007). O presente trabalho adota os critérios constantes na Resolução nº 899 da ANVISA, como base para o desenvolvimento do método de controle de qualidade do extrato aquoso preparado com *Himatanthus lancifolius*.

De acordo com esta resolução os tipos de testes para validação são classificados em 4 categorias (Quadro 2) e para cada categoria é exigido um conjunto de testes (Quadro 3).

O método é considerado validado quando os parâmetros especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão, robustez são determinados e verificados; sendo que a robustez é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas deliberadas variações dos parâmetros analíticos (Quadro 4) (BRASIL, 2003).

| Categoria | Finalidade do teste |
|------------------|---|
| I | Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas |
| II | Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas |
| III | Testes de performance (ex.:dissolução, liberação do ativo) |
| IV | Testes de identificação |

Quadro 2 - Classificação dos testes segundo sua finalidade.

| Parâmetro | Categoria I | Categoria II | | Categoria III | Categoria IV |
|--------------------------------|-------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | | Quantitativo | Ensaio limite | | |
| Seletividade | Sim | Sim | Sim | * | Sim |
| Linearidade | Sim | Sim | Não | * | Não |
| Intervalo | Sim | Sim | * | * | Não |
| Precisão Repetibilidade | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| Intermediária | ** | ** | Não | ** | Não |
| Limite de detecção | Não | Não | Sim | * | Não |
| Limite de quantificação | Não | Sim | Não | * | Não |
| Exatidão | Sim | Sim | * | * | Não |
| Robustez | Sim | Sim | Sim | Não | Não |

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão.

Quadro 3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

| | Estabilidade das soluções analíticas |
|------------------------------|---|
| Preparo das amostras | Tempo de extração |
| Espectrofotometria | Variação do PH da solução |
| | Temperatura |
| | Diferentes fabricantes de solventes |
| Cromatografia líquida | Variação do pH da fase móvel |
| | Variação na composição da fase móvel |
| | Diferentes lotes ou fabricantes de colunas |
| | Temperatura |
| | Fluxo da fase móvel |
| Cromatografia gasosa | Diferentes lotes ou fabricantes de colunas |
| | Temperatura |
| | Velocidade do gás de arraste |

Quadro 4 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para a padronização de derivados obtidos a partir da casca de *Himatanthus lancifolius*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente e microquimicamente as cascas de *H. lancifolius* obtidas na região.

- Detectar alcalóides presentes em extratos da casca de *Himatanthus lancifolius*.

- Validar uma metodologia para a quantificação dos alcalóides totais no extrato aquoso.

- Quantificar os alcalóides totais no extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius*.

4 MATERIAIS

4 MATERIAIS

4.1 Material vegetal

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Pará (UFPA). Inicialmente, utilizou-se a casca seca fornecida, com o devido laudo de análise, por um laboratório comercial, amostra **Q**, e em seguida empregou-se uma nova amostra comercial de casca seca, amostra **S**. Em janeiro de 2009 coletou-se, no turno da manhã, uma terceira amostra composta de cascas frescas do vegetal na Fazenda do Mocambo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a qual foi devidamente identificada estando sua exsicata armazenada no herbário do Instituto Agrônomo do Norte sob o registro 183977, e que é referida neste trabalho como amostra **E**.

4.2 Substâncias puras

- ✓ Uleína isolada e fornecida pelo Prof. Titular Dr. Cid Aimbiré M. Santos da Universidade Federal do Paraná.
- ✓ cloridrato de ioimbina da marca Indo Phytochem Farmacêutica, com grau de pureza 99,02%.

4.3 Solventes e reagentes

Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza p.a. e eram da marca Quimex quando não citado no texto.

Foram utilizados:

Acetato de etila, acetonitrila - Baker Analyzed® HPLC, ácido fórmico, ácido acético glacial, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, água ultra pura tipo I LAFQ, anidrido acético, clorofórmio, etanol 96°GL, etanol, butanol, isopropanol, sulfato de sódio anidro, n-hexano - NUCLEAR, metanol, hidróxido de amônio, metanol UV/CLAE espectroscópico 99,9% - VETEC e SIGMA-ALDRICH.

Reativos de Kedde, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Fehling A e B: preparados no Laboratório de Fitoquímica (BARBOSA et al, 2003).

Solução de cloreto férrico 1% e 10%, lugol, ninhidrina a 1%, ácido clorídrico a 1%, ácido sulfúrico etanólico 12%, vanilina a 1%, carbonato de sódio a 25%, formaldeído a 4%, *o*-dinitrobenzeno a 5%, hidroxilamina a 10%, solução metanólica de hidróxido de potássio a 10%, solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, HCl 1*N*, hidroxilamina a 10%, solução aquosa de vanilina a 1%, HCl 6*N*, peróxido de hidrogênio concentrado (30%), lugol, hipoclorito de sódio 50%, ácido acético 5%, azul de astra, safranina, glicerina 50%, etilenodiamina 98% preparados no Laboratório de Fitoquímica (BARBOSA et al., 2003).

4.4 Suporte cromatográfico

Gel de sílica de fase normal, da marca Merck, para a confecção de cromatoplasmas, cromatofolhas de gel de sílica de fase normal sobre alumínio e cromatoplasmas de vidro com mesmo suporte, já preparadas.

4.5 Equipamentos

Balança analítica Bioprecisa FA2104N; banho de ultrason Quimis Modelo Q-335D; agitador eletromagnético de peneiras Bertel; balança analítica Gehaka BK 500; estufa termoestabilizada Quimis; balança analítica modelo BK 500; evaporador rotativo Buchi Switzerland modelo R-3000; bomba de vácuo modelo TE-058; banho-maria com termostato Fisatom; gabinete para visualização sob luz ultravioleta (254 e 365nm); micropipetadores transferpette Brande calibrados; cromatógrafo a líquido de alta eficiência Merck Hitachi modelo LaChrom® D-7000, qualificado segundo a última edição da Farmacopeia Europeia e Japonesa; espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 UV-VIS calibrado.

5 MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 Tratamento do material vegetal

Como as amostras obtidas no mercado já se encontravam limpas, sem a cortiça e secas, a casca fresca coletada na EMBRAPA foi submetida à limpeza para obter-se a uniformidade das amostras.

A amostra E foi limpa por raspagem com o auxílio de uma espátula para a retirada de musgo e sujidades que se encontravam depositados sobre ela; sendo então cortada em pedaços menores, que por sua vez foram lavados em álcool 92,8° INPM (96°GL), a temperatura ambiente, para limpar o material. Retirou-se a cortiça da casca e só então a mesma foi posta para secar a 40°C em estufa com circulação forçada de ar.

5.2 Preparo do material vegetal para testes microquímicos e caracterização anatômica

As cascas da amostra E foram cortadas e colocadas para ferver sob pressão (~ 2atm) por 12 h; após esfriar o material foi dividido em duas partes. Uma conservada em água destilada para os testes de microquímica e outra que foi colocada em etilenodiamina 98% por 24 h e posteriormente lavada com água destilada para que se processasse a montagem de lâminas para caracterização anatômica.

5.3 Montagem das lâminas para caracterização anatômica

Foram obtidos, na amostra E, cortes à mão livre nos sentidos longitudinal tangencial, longitudinal radial e transversal que foram postos em água destilada, a seguir, os cortes foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio 50%, sendo então lavados em água destilada e passados em ácido acético 5%, seguindo-se nova lavagem com água destilada para então corar com azul de astra 1% e safranina 1%, procedendo-se uma nova lavagem com água destilada para então montar a lâmina com glicerina 50% cobrindo o corte com lamínula, seguindo-se a vedação com esmalte (KRAUS & ARDUIN,1997).

5.4 Montagem das lâminas para os testes microquímicos

Foram obtidos cortes da amostra E, à mão livre nos sentidos longitudinal tangencial, longitudinal radial e transversal, que foram colocados em água destilada, a seguir, os cortes foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio 50%, sendo então lavados em água destilada e transferidos para as lâminas sendo retirado o excesso de água com o auxílio de papel filtro; os reagentes referentes a cada teste foram instilados sobre os cortes em suas respectivas lâminas, o excesso foi retirado com papel filtro para então finalizar a montagem da lâmina com glicerina 50% cobrindo-se o corte com lamínula, seguindo-se de vedação com esmalte (KRAUS & ARDUIN,1997).

5.5 Testes microquímicos

5.5.1 ALCALÓIDES

O reagente de Dragendorff foi instilado sobre os cortes, aguardando-se 1 a 2 min para então se finalizar a montagem das lâminas.

Reativo de Dragendorff para histoquímica

Solução I: 8 g de nitrato de bismuto

20 mL de ácido nítrico30%

Solução II: 22,8 g de iodeto de potássio

25 mL de água destilada

Adicionar aos poucos a solução I sobre a II, deixar em repouso durante duas horas, filtrar e completar o volume com água destilada até 100ml (COSTA, 1982).

5.5.2 FLAVONÓIDES

Uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 5% foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 min para então se finalizar a montagem das lâminas (COSTA, 1982).

5.5.3 ANTRAQUINONAS

Uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 5% foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 min para então se finalizar a montagem das lâminas (COSTA, 1982).

5.5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Uma solução de cloreto férrico a 10% foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 min para então se finalizar a montagem das lâminas (JOHANSEN, 1940; apud KRAUS e ARDUIN, 1997).

Cloreto férrico 10%

| | |
|----------------------------------|-------|
| Carbonato de sódio..... | 0,3g |
| Cloreto férrico hexidratado..... | 10g |
| Água destilada q.s.p..... | 100mL |

5.5.5 AÇÚCARES REDUTORES

A mistura da solução A com a B (1:1 v/v) foi instilada sobre os cortes que foram então aquecidos em placa aquecedora até a fervura para em seguida finalizar a montagem das lâminas (PURVIS et al, 1964; apud KRAUS e ARDUIN, 1997).

Reagente de Fehling

Solução A

| | |
|------------------------------------|------|
| Sulfato cúprico pentaidratado..... | 3,4g |
| Água destilada q.s.p..... | 50mL |

Solução B

| | |
|--|-------|
| Hidróxido de sódio..... | 5,0 g |
| Tartarato de sódio e potássio tetraidratado..... | 17,5g |
| Água destilada q.s.p..... | 50mL |

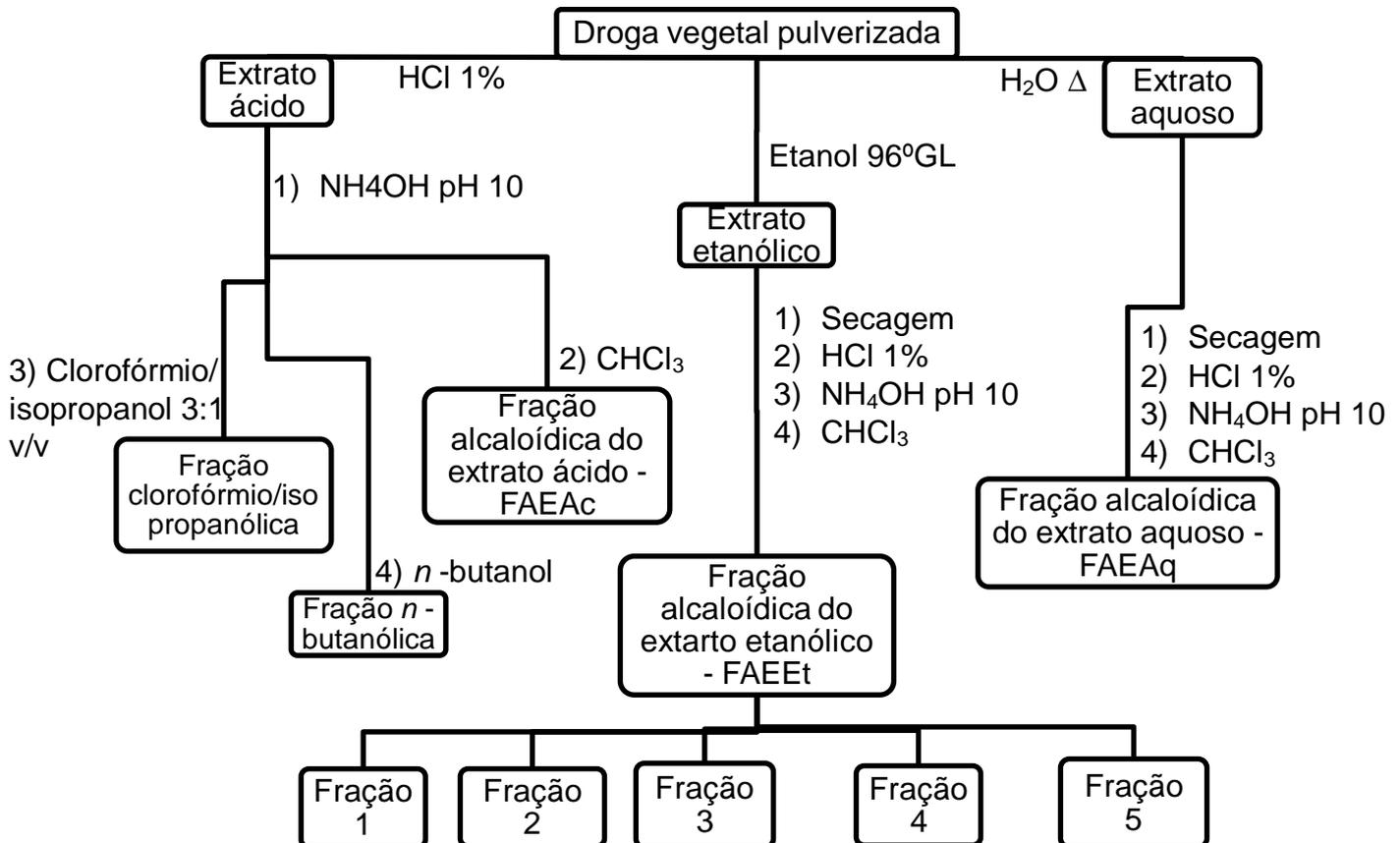
5.5.6 AMIDO

Sobre os cortes vegetais instilou-se lugol aguardando-se 5 min para então se finalizar a montagem das lâminas (KRAUS e ARDUIN, 1997).

5.6 Determinação da distribuição granulométrica do pó das cascas de *Himatanthus lancifolius*

As amostras Q, S e E foram trituradas em moinho de facas e foram submetidas à análise granulométrica utilizando-se agitador eletromagnético para peneiras onde 10 g do pó foram submetidos a tamização em série usando-se malhas com abertura de 2,00 e 1,40 mm e 710, 355, 250, 180, 125 μm ; agitados por 30 min, pesando-se posteriormente o pó retido em cada tamiz (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

5.7 Obtenção dos extratos e frações



Esquema 1: Esquema geral da obtenção dos extratos e frações.

5.7.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ÁCIDO

Quarenta gramas do pó da casca de *H. lancifolius* foram desengordurados com *n*-hexano sob refluxo; após o que a droga vegetal foi colocada para secar a temperatura ambiente e então se seguiu a extração por maceração em HCl 1% por 48 h. O macerado obtido foi filtrado sob pressão reduzida e a temperatura ambiente. O processo foi repetido por três vezes, após um único tratamento com *n*-hexano (Esquema 1).

5.7.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Foram pesados 100g da casca pulverizada, os quais foram colocados em recipiente fechado com 300mL de etanol, ao abrigo da luz e a temperatura variando entre 15 e 25°C, por uma semana. Após esse período o material foi filtrado sob pressão reduzida, sendo o pó remanescente no filtro lavado com mais 200mL de etanol (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1926).

A tintura foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida e seca em estufa a aproximadamente 50°C por 48h (Esquema 1).

5.7.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

Foram aquecidos 1000mL de água ultrapura até a fervura, em seguida foram acrescentados 50g da casca pulverizada deixando-a ferver por mais 10 min. Após esfriar, o material foi filtrado sob pressão reduzida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1926).

O extrato aquoso foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e seco em estufa a aproximadamente 50°C por 48h (Esquema 1).

5.7.4 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA

Para a obtenção da fração alcaloídica, 950mL do extrato ácido foram alcalinizados com carbonato de cálcio até pH 10. Depois então realizou-se partição líquido-líquido com clorofórmio, clorofórmio/isopropanol (3:1 v/v) e *n*-butanol

sucessivamente. Um volume de 240 mL de extrato alcalinizado foi tratado com 4 alíquotas de clorofórmio, sendo a primeira de 100 mL e as demais de 50 mL; seguido de 4 alíquotas de clorofórmio/isopropanol (3:1 v/v) na mesma proporção e 2 alíquotas de 50 ml com *n*-butanol. As frações foram coletadas em erlenmeyer, separadamente, e a clorofórmica (alcaloídica) foi filtrada sobre sulfato de sódio anidro.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo em banho-maria sem aquecimento sob pressão reduzida, com exceção da fração *n*-butanólica a qual também foi colocada em evaporador rotativo, porém ajustando-se a temperatura entre 40° e 45°C, pois o azeótropo formado com a água adicionada desproporcionava a medida que evaporava.

Em experimentos posteriores, o extrato ácido foi alcalinizado com hidróxido de amônio até atingir pH 10. Em seguida realizou-se a partição líquido-líquido com clorofórmio, nas condições anteriores, monitorada pela observação da fração na forma de “spot” sobre cromatoplaça. As frações foram coletadas e reunidas em erlenmeyer; filtradas sobre sulfato de sódio anidro e então levadas a concentrar em evaporador rotativo em banho maria sem aquecimento e sob pressão reduzida, completando-se a secagem em estufa.

A mesma técnica de partição foi empregada nos extratos secos das amostras Q, S e E; partindo-se de 0,5g do extrato etanólico ou aquoso concentrados, tratados com 40 mL de HCl 1% e, após a alcalinização com hidróxido de amônio até pH 10, foi procedida a partição com clorofórmio empregando-se os volumes citados anteriormente.

5.8 Cálculo do rendimento das extrações e dos fracionamentos

O rendimento de cada extrato, etanólico e aquoso, e das frações alcaloídicas foi calculado a partir da relação percentual entre a massa de material vegetal utilizada no processo e a massa do extraído seco, obtida após concentração em evaporador rotativo e secagem em estufa.

5.9 Prospecção fitoquímica

5.9.1 DOS EXTRATOS ÁCIDOS

Os extratos ácidos das amostras Q, S e E foram submetidos a testes em via úmida com reativo de Dragendorff (BARBOSA et al., 2001), usando-se como referência a uleína isolada. Foi utilizado 1 mL de cada amostra e 10 gotas do reativo de Dragendorff.

Reativo de Dragendorff

a) Solução estoque

Solução I: 4 g de nitrato de bismuto

20 mL de ácido acético glacial

Solução II: 13,7 g de iodeto de potássio

25 mL de água destilada

Adicionar aos poucos a solução I sobre a II.

b) Solução para borrifar cromatoplasmas

1 mL da solução estoque

2 mL de ácido acético glacial

10 mL de água destilada

5.9.2 DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E AQUOSOS

A prospecção foi realizada, segundo o Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (BARBOSA et al., 2001), nos extratos etanólicos das amostras Q, S e E e no extrato aquoso da amostra Q e E.

5.9.2.1 Saponinas

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é dissolvida em 5 mL de água destilada, e em seguida diluída para 15 mL, então agita-se verticalmente a solução em tubo fechado, vigorosamente, por 2 min.

Se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora o resultado é considerado positivo para saponina.

5.9.2.2 Açúcares redutores

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é dissolvida em 5 mL de água destilada; filtra-se quando necessário. Adicionam-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. A mistura é aquecida em banho maria em ebulição por 5 min.

O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo indica a presença de açúcares redutores.

5.9.2.3 Polissacarídeos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é dissolvida em 5 mL de água destilada; filtra-se quando necessário. Adicionam-se II gotas de Lugol.

O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo.

5.9.2.4 Fenóis e taninos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é dissolvida em 5 mL de água destilada; filtra-se quando necessário e adicionam-se I ou II gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%.

Qualquer mudança de coloração ou formação de precipitado indica reação positiva quando comparado ao teste em branco (água + sol. de FeCl_3 1%).

Coloração inicial entre o azul e o vermelho indica a presença de fenóis, quando o teste em branco é negativo.

Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e verde, a presença de taninos condensados.

5.9.2.5 Glicosídeos cardiotônicos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é dissolvida em 5 mL de metanol; filtra-se se necessário. Separam-se duas porções de 2 mL cada e adicionam-se II gotas do reativo de Kedde.

Coloração azul ou violeta indica reação positiva.

5.9.2.6 Flavonóides

Uma alíquota de 50 mg dos extratos secos é dissolvida em 10 mL de metanol; filtra-se se necessário. Adicionam-se V gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.

O surgimento da coloração rósea a vermelha na solução indica reação positiva.

5.9.2.7 Alcalóides

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos é tratada com 5 mL de solução de HCl a 5%; filtra-se se necessário. Separam-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionam-se gotas dos reativos abaixo:

- a) Reativo de Bouchardat: Resultado positivo se houver formação de precipitado laranja avermelhado.
- b) Reativo de Dragendorff: Resultado positivo se houver formação de precipitado vermelho tijolo.
- c) Reativo de Mayer: Resultado positivo se houver formação de precipitado branco.

5.9.2.8 Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Dissolvem-se 15 mg dos extratos secos em 3 mL de metanol; filtra-se se necessário. Adicionam-se II gotas de Na_2CO_3 a 25%, II gotas de formaldeído a 4% e II gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. A mistura é aquecida em banho maria.

Coloração violeta indica reação positiva.

5.9.2.9 Sesquiterpenolactonas e outras lactonas

Dissolvem-se 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol; filtra-se se necessário. Adicionam-se XII gotas da solução alcoólica de hidroxilamina a 10% e II gotas de solução metanólica de KOH a 10%. A mistura é aquecida suavemente em banho maria por 2 min. Após resfriada, a solução é acidificada HCl 1 *N*. Adiciona-se ainda I gota de FeCl₃ a 1%.

O aparecimento de coloração violeta indica reação positiva.

5.9.2.10 Proteínas e aminoácidos

Dissolver cerca de 15mg do extrato alcoólico em 3mL de água destilada; filtrar se necessário. Adicionar 0,5mL de solução aquosa de ninhidrina a 1%, aquecer até a ebulição.

O aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

5.9.2.11 Catequinas

Dissolver cerca de 15mg do extrato seco em 3mL de metanol. Filtrar se necessário. Juntar 1mL de solução aquosa de Vanilina a 1% e 1mL de HCl concentrado.

O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

5.9.2.12 Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntar cerca de 5mg do extrato seco, III gotas de solução de HCl 6*N* e duas gotas de H₂O₂ concentrado (30%). Evaporar em BM. Deve haver formação de um resíduo corado de vermelho. Juntar III gotas de solução de NH₄OH 6*N*.

O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

5.10 Análise dos extratos e frações por cromatografia de camada delgada (CCD)

A fração hexânica obtida com o desengorduramento do material vegetal e as frações clorofórmica, clorofórmio/isopropanólica e *n*-butanólica foram analisadas por CCD. Os cromatogramas foram obtidos usando-se cromatoplaças de 5cm x 10cm de gel de sílica de fase normal, experimentando várias combinações de solventes orgânicos em proporção volumétrica:

1. Hexano/acetona (80:20),
2. Clorofórmio/metanol (90:10 e 85:15),
3. Hexano/acetato (75:25),
4. Hexano/metanol (96:4),
5. Clorofórmio/acetato de etila (75:25 e 85:15),
6. Clorofórmio/acetona (85:15),
7. Hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5:4:0,8:0,2).

Foram realizadas também análises por CCD com as frações alcaloídicas do extrato etanólico das amostras Q, S e E utilizando-se os seguintes eluentes:

8. Hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5:4:0,8:0,2),
9. Hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2),
10. Hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (6:3:0,8:0,2).

As frações alcaloídicas foram submetidas à análise por co-cromatografia em camada delgada utilizando-se uleína e cloridrato de ioimbina como referência.

Logo após o desenvolvimento e evaporação do eluente, os cromatogramas foram observados sob luz UV de 254 e 365 nm, sendo ainda revelados com o reagente de Dragendorff e, em seguida, aspergidos com solução de ácido sulfúrico etanólico 12% para intensificar a reação.

5.11 Obtenção de frações por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP)

Com a intenção de isolar componentes da fração alcaloídica da amostra E, foi realizada CCD preparativa sobre placa de gel de sílica de fase normal de 20cm X 20cm, onde foram aplicados 40mg da fração FAEEt (Esquema 1) obtida a partir de E. Utilizou-se como fase móvel o sistema 9 (item 5.10) e, após a eluição, foi

possível visualizar 5 frações, sob luz UV a 254nm, as quais foram obtidas após raspagem e lavagem da zona cromatográfica com 60 mL de clorofórmio. Cada fração, depois de filtrada, foi concentrada em evaporador rotativo em banho-maria sem aquecimento e sob pressão reduzida.

As frações foram numeradas de 1 a 5 e submetidas a análise por CCD para comparação com a uleína e com o cloridrato de ioimbina utilizando-se cromatoplasmas de 5cm x 10cm de gel de sílica de fase normal e como fase móvel o sistema 9.

5.12 Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para esta etapa foi utilizado um cromatógrafo marca MERCK-ITACHI®, modelo LaChrom 7000 com detector de UV com arranjo de diodos (CLAE-DAD) qualificado, sendo realizada a análise das frações alcaloídicas obtidas a partir dos extratos etanólicos e aquosos de Q e de E; das frações 1, 2, 3, 4 e 5, obtidas por CCDF (item 5.11); uleína e ioimbina.

5.12.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC obtendo-se uma concentração final de 1mg/mL, filtrando-se em seguida sobre membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com poros de 0,22µm de diâmetro.

5.12.2 PROGRAMAÇÃO DE ANÁLISE

Faixa de detecção: UV 200-400nm

Registro de cromatogramas: 250,305,330 e 350nm

Fluxo: 0,8mL/min

Coluna: Chromolith RP 18 (100 x 4,5mm), marca Merck®

Fase móvel: Acetonitrila/ácido fosfórico 0,5% - em gradiente iniciando com 10:90 e terminando com 60:40.

Tempo de análise: 30 min

Volume de injeção fixo: 20 µL

5.13 Validação do método espectrofotométrico para a quantificação de alcalóides totais

Para esta etapa foi utilizado um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50 UV-VIS certificado e calibrado. Foram analisadas, a temperatura ambiente, a fração alcaloídica do extrato aquoso da amostra E e o cloridrato de ioimbina.

5.13.1 AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA

Utilizaram-se amostras da fração alcaloídica do extrato aquoso de *H. lancifolius* e soluções de referência de cloridrato de ioimbina (99,02%). As soluções foram preparadas por diluição da solução estoque de ioimbina a 1mg/mL em volumes apropriados de metanol de grau analítico da marca VETEC, a fim de se obter concentrações de 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28µg/mL.

5.13.2 PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO

5.13.2.1 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A seletividade do método foi avaliada através da comparação do espectro obtido para a fração alcaloídica do extrato aquosos de *H. lancifolius* e para a ioimbina comparando-se o máximo de absorção de ambas as amostras.

5.13.2.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar dentro de um intervalo especificado que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

A linearidade do método foi avaliada empregando-se soluções de ioimbina nas seguintes concentrações: 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28µg/mL. Cada concentração foi medida em quintuplicata em espectrofotômetro. As médias das absorções de

cada concentração de ioimbina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por $y = a \pm bx$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (FDA, 2001; BRASIL, 2003).

5.13.2.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003). Desta forma, a faixa de intervalo empregada (16 a 28 µg/mL) para análise quantitativa, foi estabelecida de acordo com a média das absorções encontrada para ioimbina (alcance de 80% a 120%).

5.13.2.4 Curva de calibração

A curva de calibração para a ioimbina foi construída considerando-se o intervalo encontrado. Sendo assim, as médias das absorções de cada concentração de ioimbina foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta ($y = a \pm bx$) e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das absorções (FDA, 2001; BRASIL, 2003).

4.13.2.5 Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e inclui a verificação da repetibilidade, da precisão intermediária e do cálculo da precisão.

Repetibilidade (precisão intra-corrida): A repetibilidade do método foi verificada pela medição em espectrofotômetro (281nm), de três concentrações, baixa (16 µg/mL), média (20 µg/mL) e alta (28 µg/mL) com três réplicas cada.

Precisão intermediária: Esta propriedade foi verificada pela medição em espectrofotômetro (281nm), de três concentrações, baixa (16 µg/mL), média (20

µg/mL) e alta (28 µg/mL) com três réplicas cada em dias diferentes, por dois analistas diferentes.

Cálculo da precisão: A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. Não se admite variação acima de 5%.

5.13.2.6 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em desenvolvimento em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). Neste trabalho foi empregada a análise espectrofotométrica da ioimbina, de pureza conhecida. A exatidão é calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$E (\%) = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: E (%) é a exatidão, CME é a concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

5.13.2.7 Limite de detecção

É a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de métodos instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser determinada pela equação:

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \quad (3)$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração.

5.13.2.8 Limite de quantificação

É a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela equação:

$$LD = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (4)$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração.

5.13.2.9 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada variando-se a origem do solvente utilizado (BRASIL, 2003) (Quadro 4) de metanol grau analítico VETEC (1), para metanol grau analítico SIGMA-ALDRICH (2), foram feitas três determinações em concentrações baixa (16 µg/mL), média (20 µg/mL) e alta (28 µg/mL), com três réplicas cada. Os máximos de absorção obtidos para as soluções preparadas com as duas marcas de solventes foram comparados.

5.14 Quantificação dos alcalóides totais presentes no extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius*

Após validação de metodologia espectrofotométrica utilizando-se a ioimbina como referência, pode-se quantificar os alcalóides totais presentes no extrato aquoso de *H. lancifolius* utilizando-se a equação da reta obtida com a curva de calibração.

A fração alcaloídica seca obtida do extrato aquoso foi dissolvida em metanol grau analítico até a concentração de 30µg/mL e então submetida à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 281nm.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cascas coletadas na EMBRAPA, amostra E, foram limpas e tiveram a sua cortiça retirada para ficarem com aspecto físico idêntico ao das amostras comerciais, trabalhando-se dessa forma com amostras uniformes.

A caracterização anatômica e microquímica foram realizadas apenas para a amostra E, a única que possui identificação botânica inequívoca já que não foi possível, de acordo com as análises realizadas, caracterizar as amostras comerciais como sendo *H. lancifolius*.

6.1 Caracterização anatômica das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson

Na análise de cascas que durante o seu preparo sofre remoção de suas camadas mais externas não se encontra o súber (OLIVEIRA E AKISUE, 1979; GLÓRIA E GUERREIRO, 2003), como é o caso da amostra pesquisada. Foi possível observar que a casca estudada apresenta córtex com grupos de fibras do floema primário inclusos, raio apresentando tecido de dilatação e percurso ondulado e anastomosado sendo ora unisseriados e ora multisseriados (Figuras 4 e 6).

Em *Himatanthus sucuuba* e *Forsteronia glabrescens* os canais lactíferos são encontrados no córtex, no floema e no parênquima medular (LARROSA, 2005; LARROSA, 2006) enquanto que na casca de *Himatanthus lancifolius* observam-se canais lactíferos que se estendem radialmente no floema, além de ocorrerem fibras não lignificadas no periciclo (Figuras 4 e 5). Foram encontradas, também na região do floema, células pétreas (Figura 4), amido e cristais rômnicos de oxalato de cálcio (Figuras 7 e 8), sendo diferente da espécie *H. sucuuba*, onde os cristais de oxalato de cálcio apresentam-se na forma de drusa ou prismas (LARROSA, 2005) e da *F. glabrescens* onde esses cristais apresentam-se na forma de prismas (LARROSA, 2006).

Na família Apocynaceae os lactíferos podem estender-se radialmente no floema e quase invariavelmente ocorrem fibras não lignificadas, isoladas ou em grupos no periciclo (CRONQUIST, 1981 apud LARROSA, 2005; GLÓRIA E GUERREIRO, 2003), essas estruturas podem ser observadas na casca de *Himatanthus lancifolius* (Figuras 4 e 5).

As células pétreas, que são esclereídes, podem estar presentes nos caules, em folhas ou ainda em frutos (GLÓRIA E GUERREIRO, 2003). Em *Himatanthus lancifolius* foram encontradas na região do floema o que condiz com a literatura que afirma que são componentes comuns do floema, as células parenquimáticas não especializadas, fibras e esclereídes (Figura 4). As células parenquimáticas podem conter diferentes substâncias como amido, taninos e cristais (GLÓRIA E GUERREIRO, 2003). Em *Himatanthus lancifolius* foram encontrados cristais de oxalato de cálcio e amido (Figuras 7 e 8).

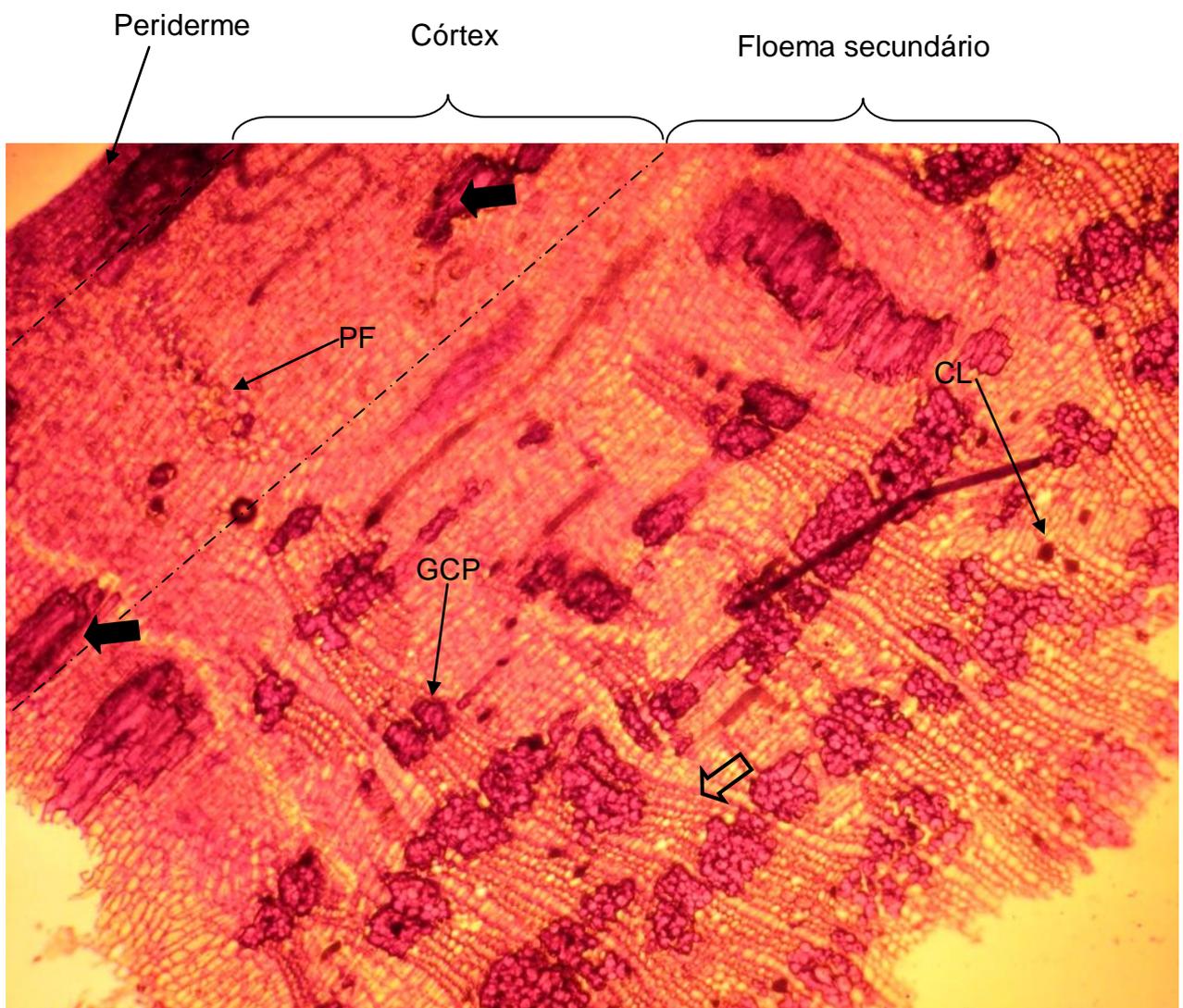


Figura 4 - Seção transversal da casca de *Himatanthus lancifolius*. Corada com safranina e observada em microscópio com aumento de 10X. Gupos de fibras do floema primário (■), raio (□). CL: Canais Lactíferos; GCP: Grupo de Células Pétreas; PF: Periciclo fibroso.

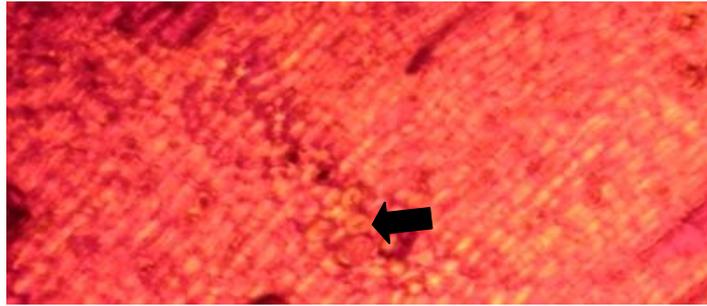


Figura 5 - Detalhe de fibras não lignificadas em grupos no periciclo. Seção transversal da casca de *H. lancifolius* corado com safranina e observado em microscópio com aumento de 10X.

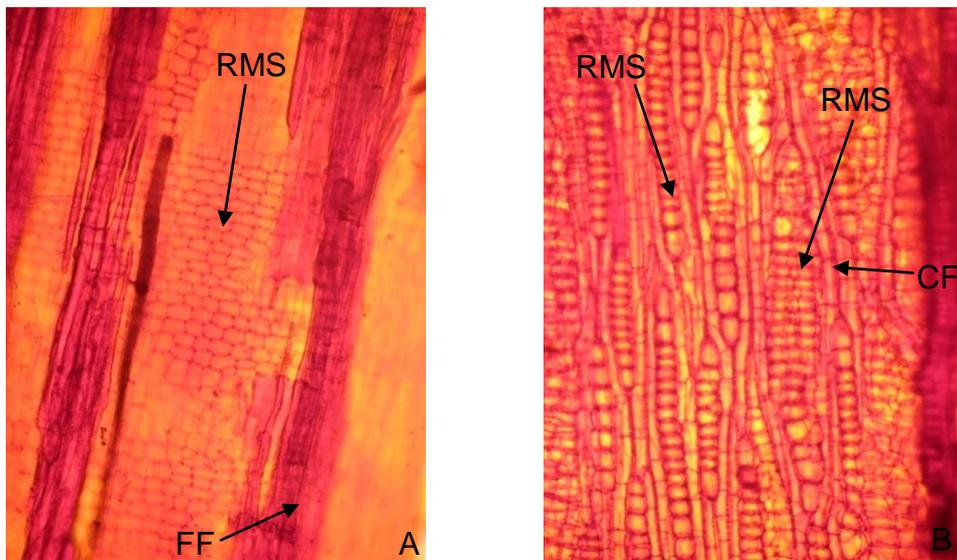


Figura 6 - Detalhe dos raios da casca de *Himatanthus lancifolius*. A: Seção longitudinal radial; B: Seção longitudinal tangencial. Cortes corados com safranina e observados em microscópio com aumento de 10X. CF: Células Fusiformes; FF: Feixe de Fibras; RMS: Raio Medular Secundário.

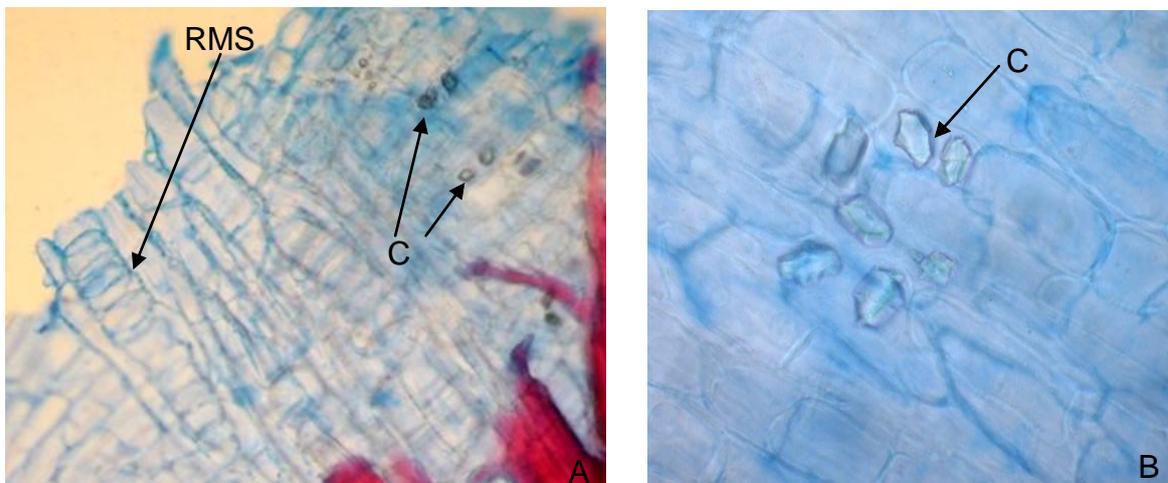


Figura 7 – Destaque para os cristais da casca de *Himatanthus lancifolius*. A: Seção longitudinal tangencial observada com aumento de 10X. B: Seção longitudinal tangencial observada com aumento de 40X. Corados com azul de astra e safranina. C: Cristais; RMS: Raio Medular Secundário.

6.2 Testes microquímicos com as cascas de *Himatanthus lancifolius*

Com a realização dos testes microquímicos detectou-se nas cascas de *H. lancifolius*, amostra E, a presença de alcalóides, os quais localizam-se, de preferência, nos tecidos externos de raízes e caules, nas epidermes e também no mesófilo das folhas, no tegumento das sementes, entre outros. Nas células vivas aparecem dissolvidos no plasma dos vacúolos, sob a forma de sais de certos ácidos orgânicos; nas plantas secas permanecem no interior das células mortas (COSTA, 1982).

O teste foi positivo também para flavonóides, pois os flavonóides encontram-se localizados, habitualmente, nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, nas camadas em paliçada, nos parênquimas esponjosos, dissolvidos no suco celular sob a forma de heterosídeos; quando o conteúdo atinge um valor elevado aparecem sob a forma de cristais ou de massas coradas de amarelo. Solubilizam-se nos hidróxidos alcalinos e resultam em soluções mais intensamente coradas de amarelo alaranjado ou escurecido (COSTA, 1982).

A positividade para alcalóides e flavonóides na casca e no extrato aquoso é de extrema significância, já que mostra que a parte da planta mais utilizada como medicinal possui importantes grupos ativos e produz um extrato mantendo esses grupos, com destaque para os alcalóides que são reconhecidamente um importante metabólito do vegetal estudado.

A amostra se mostrou positiva para açúcares redutores e amido, uma vez que o teste de Fehling indica a presença de açúcares redutores devido a formação de precipitados vermelho-brilhantes (PURVIS, 1964) e o lugol reage com amido dando uma coloração azul-negra ou marrom muito escuro (KRAUS e ARDUIN, 1997).

Os resultados dos testes microquímicos podem ser observados na Figura 8.

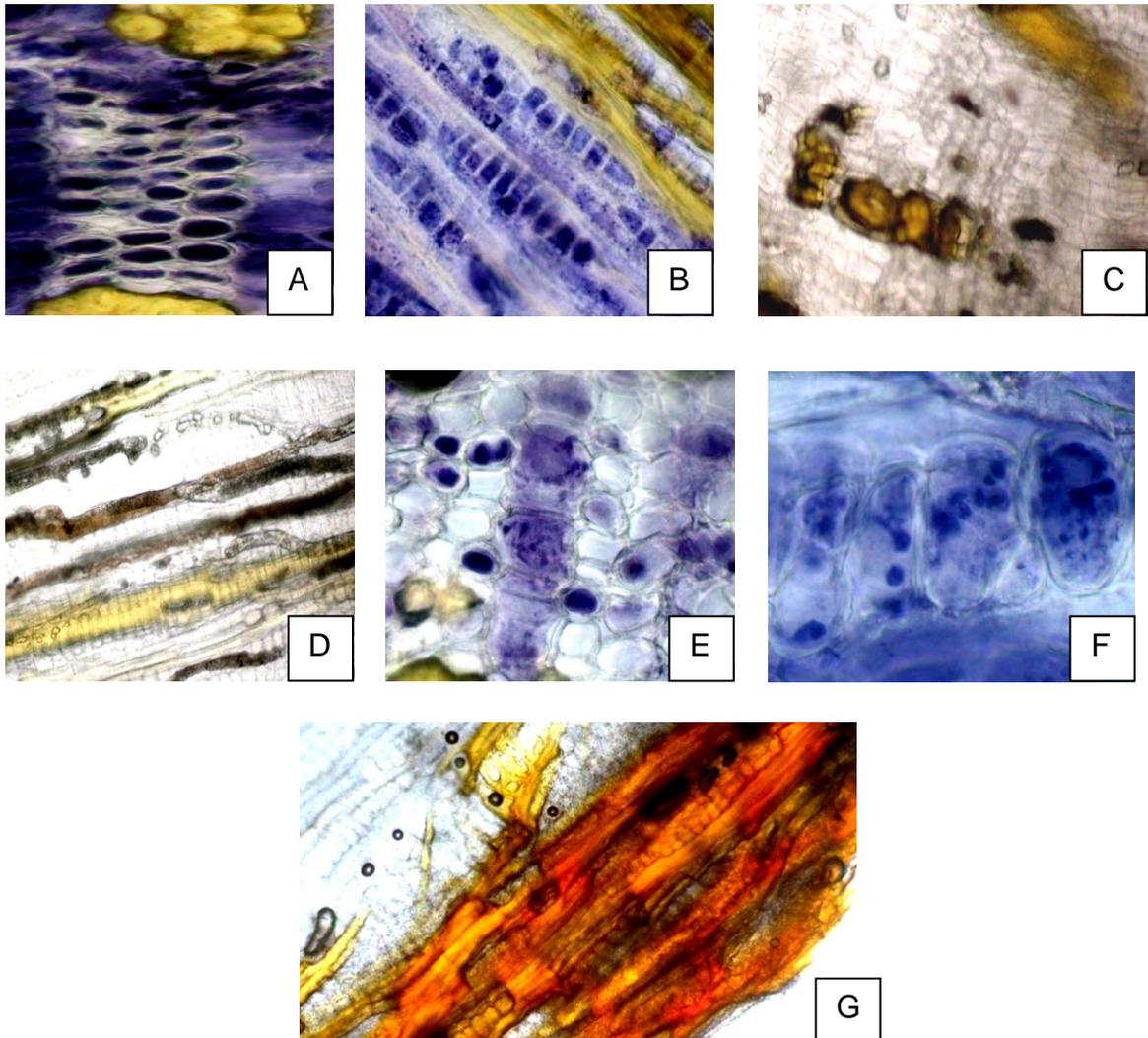


Figura 8 - Destaque para testes microquímicos em *Himatanthus lancifolius*.

- A - Corte transversal corado com Dragendorff observado com aumento de 10X mostrando reação positiva para alcalóides.
- B - Corte longitudinal tangencial corado com Dragendorff observado com aumento de 10X mostrando reação positiva para alcalóides.
- C - Corte transversal corado com KOH 5% observado com aumento de 10X mostrando positividade para flavonóides e negatividade para antraquinonas.
- D - Corte longitudinal tangencial corado com KOH 5% observado com aumento de 10X mostrando positividade para flavonóides negatividade para antraquinonas.
- E - Corte transversal corado com lugol observado com aumento de 40X mostrando positividade para amido.
- F - Corte longitudinal tangencial corado com lugol observado com aumento de 40X mostrando positividade para amido.
- G - Corte longitudinal tangencial corado com reagente de Fehling observado com aumento de 10X mostrando positividade para açúcares redutores.

6.3 Determinação da distribuição granulométrica do pó das cascas de *Himatanthus lancifolius*

A análise granulométrica do material vegetal triturado é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois pode influenciar diretamente na eficiência do processo extrativo. Após a tamização do pó da casca de *H. lancifolius*, constatou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis de malha 355 μm e menos de 40% passaram pelo tamis de malha 180 μm , caracterizando-o como pó semi-fino, permitindo estimar o diâmetro médio das partículas do pó em 280 μm (Figura 9).

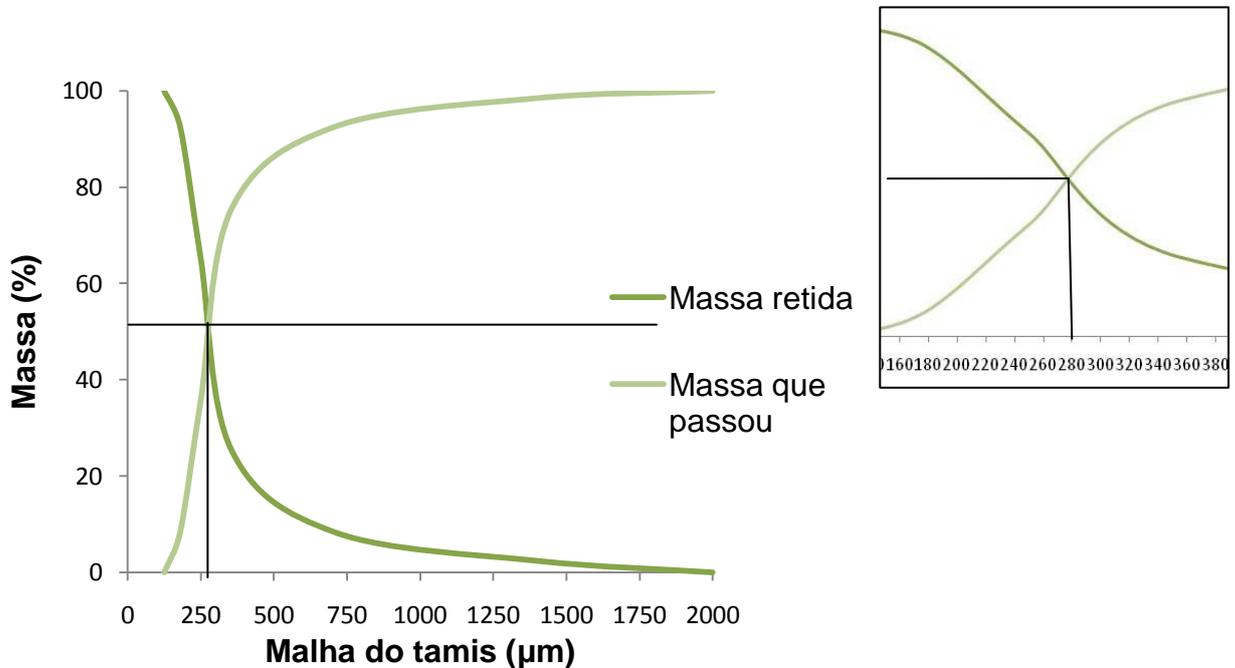


Figura 9 - Gráfico da distribuição granulométrica do pó das cascas de *Himatanthus lancifolius*, destaque para o diâmetro médio das partículas do pó ~ 280 μm .

6.4 Prospecção fitoquímica

O teste com o reativo de Dragendorff em placa escavada realizado para os extratos ácidos das amostras Q, S, E e uleína isolada mostrou clara reação positiva com a substância de referência (uleína), formando precipitado de cor vermelho tijolo, e produziu mudança de coloração nas amostras Q e E de amarelo escuro para castanho avermelhado com formação de um precipitado fino de cor escura e não

houve qualquer tipo de reação com a amostra S como se pode observar na Figura 10.

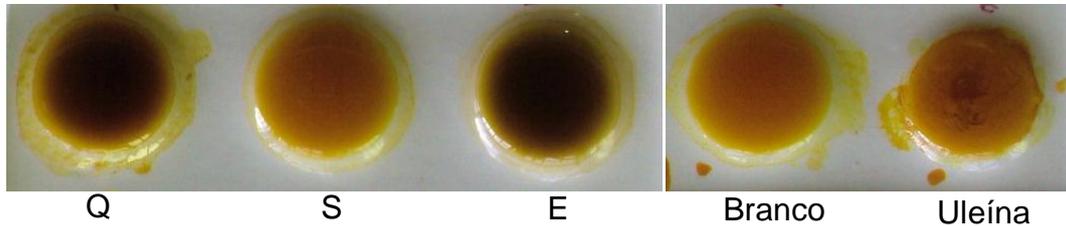


Figura 10 - Teste com reativo de Dragendorff em placa escavada.

Apesar da positividade para alcalóides e amido nos testes microquímicos com a casca, a prospecção fitoquímica realizada nos extratos etanólicos das cascas trituradas das amostras Q, S e E (*H. lancifolius*) mostra resultados negativos para alcalóides e polissacarídeos. Isso pode se dever a baixa sensibilidade dos testes, por haver algum constituinte interferindo no resultado ou a concentração de alcalóides e amido, nos extratos, ser muito baixa para detecção. O resultado da abordagem fitoquímica dos extratos etanólicos encontra-se no Quadro 5.

| Metabólitos | Amostra Q | Amostra S | Amostra E |
|--|---------------|---------------|------------|
| Saponina | + | + | Indicativo |
| Açúcares redutores | + | + | + |
| Polissacarídeos | - | - | - |
| Fenóis e taninos | + | + | + |
| Glicosídeos cardíacos | Indicativo | Indicativo | Indicativo |
| Flavonóides | Indeterminado | Indeterminado | Indicativo |
| Alcalóides | Dragendorff | - | - |
| | Bouchardart | - | - |
| | Mayer | - | - |
| Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantroquinonas | - | - | - |

Quadro 5 – Resultado da abordagem fitoquímica dos extratos etanólicos das cascas de *H. lancifolius*, amostras Q, S e E.

Já a prospecção fitoquímica realizada nos extrato aquosos das cascas das amostras Q e E (*H. lancifolius*) indica a presença de alcalóides e polissacarídeos, resultados que corroboram com os da microquímica. A prospecção fitoquímica dos extratos aquosos encontram-se no Quadro 6.

| Metabólitos | Amostra Q | Amostra E |
|--|--|--|
| Saponina | + | + |
| Açúcares redutores | + | + |
| Polissacarídeos | + | + |
| Fenóis e taninos | + | + |
| Proteínas e Aminoácidos | - | - |
| Glicosídeos cardíacos | - | - |
| Flavonóides | Indicativo | Indicativo |
| Catequinas | Indicativo | Indicativo |
| Derivados de Benzoquinonas, Naftoquinonas e Fenantraquinonas | - | - |
| Sesquiterpenolactonas | - | - |
| Purinas | Indicativo | Indicativo |
| Alcalóides { Dragendorff Bouchardart Mayer | Indicativo Indicativo Indicativo | Indicativo Indicativo Indicativo |

Quadro 6 – Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos aquosos das cascas de *H. lancifolius*, amostras Q e E.

A positividade do extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius* para alcalóides está em concordância com outros trabalhos como o de Baggio et al., 2005; Rattmann et al., 2005; Souza, 2007 e Nardin, 2006. Pode ser que a negatividade dos testes para alcalóides nos extratos etanólicos tenha ocorrido por se ter analisado diretamente as tinturas que possivelmente apresentam alcalóides em baixa concentração ou outras substâncias que podem interferir na reação, pois, os testes em CCD com as frações alcaloídicas (item 6.7) dos extratos etanólicos mostram-se positivas após revelação com reativo de Dragendorff.

6.5 Obtenção dos extratos e das frações

A fim de se avaliar a distribuição dos componentes químicos alcaloídicos do vegetal, segundo a polaridade deles, foram preparadas as frações hexânica, clorofômica, clorofômio/isopropanólica e butanólica; com o que foi possível detectar,

após análise por CCD, a ocorrência dos alcalóides apenas na fração clorofórmica, que mostra bandas de boa intensidade tanto sob luz UV quanto após o tratamento do cromatograma com reagente de Dragendorff, o que indica tratar-se de alcalóides e justifica prosseguir o trabalho investigando apenas esta fração.

6.6 Rendimento das extrações e dos fracionamentos

O rendimento de extrações e fracionamentos encontra-se listado nas tabelas 1 e 2, respectivamente, onde se pode verificar que o rendimento da extração aquosa é maior do que a etanólica, além do que, dentre as frações alcaloídicas obtidas, a que mostra maior rendimento é aquela oriunda do extrato aquoso. Diante do exposto justifica-se a escolha desse extrato para a validação do doseamento de alcalóides totais, pois o decocto também é utilizado na preparação de uso popular (Cruz, 1985) e na produção de medicamentos fitoterápicos.

Tabela 1 – Rendimento da extração etanólica e aquosa.

| Extratos | Quantidade de pó (g) | Rendimento (g) | % |
|-----------|-------------------------|-------------------|--------|
| Etanólico | 10 | 1,011 | 10,114 |
| Aquoso | 25 | 9,549 | 38,196 |

Tabela 2 – Rendimento da obtenção frações alcaloídicas dos extratos ácido, etanólico e aquoso.

| Frações | Quantidade de pó (g) | Rendimento (mg) | % |
|---|-------------------------|--------------------|-------|
| Fração alcaloídica do extrato ácido | 40 | 10,40 | 0,026 |
| Fração alcaloídica do extrato etanólico | 10 | 5,06 | 0,051 |
| Fração alcaloídica do extrato aquoso | 25 | 26,74 | 0,107 |

6.7 Cromatografia de camada delgada

Diversos eluentes foram testados e foi possível verificar que a fase móvel nº 9, hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2 v/v), foi a mais eficiente para a resolução dos cromatogramas.

A análise das frações alcalóidicas dos extratos etanólicos por CCD fornece perfis cromatográficos semelhantes para Q (amostra comercial) e E (*H. lancifolius*), que são diferentes do S (amostra comercial), evidenciando que esta amostra deve se tratar de uma espécie vegetal diferente, além de indicar a ausência do alcalóide uleína em todas as amostras (Figura 11).

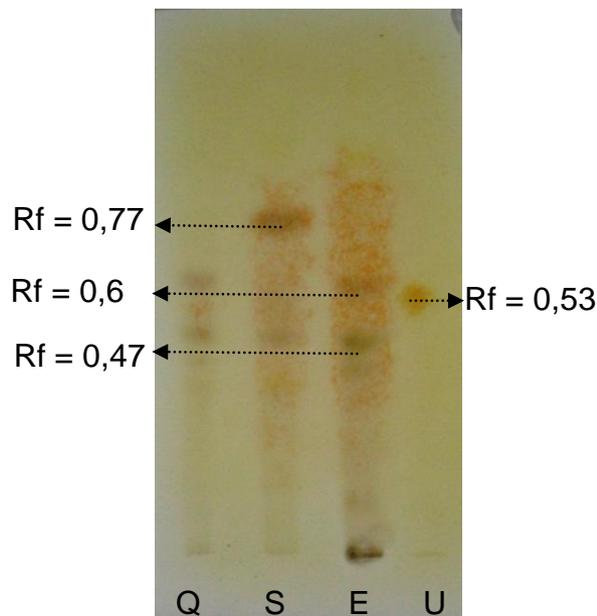


Figura 11 – Cromatograma em camada delgada da fração alcalóidica dos extratos etanólicos de Q, S, E e uleína (U) revelado com Dragendorff. Eluente: hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2 v/v).

Foi possível caracterizar fitoquimicamente, os extratos etanólico e aquoso obtidos das cascas desse vegetal, sendo que não foi detectada a presença de uleína, anteriormente reportada em outros trabalhos. No entanto, algumas considerações devem ser feitas como a possibilidade de variação na produção de metabólitos secundários por diferenças de ambiente onde as amostras foram obtidas, já que é comprovada a possibilidade de variação dos constituintes químicos

dos vegetais por: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e até indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO, 2007).

Observou-se que das frações 1, 2, 3, 4 e 5 obtidas por CCD preparativa, apenas a fração 2 mostra uma possível presença de alcalóides devido à reação com o reativo de Dragendorff como mostra a figura 12.

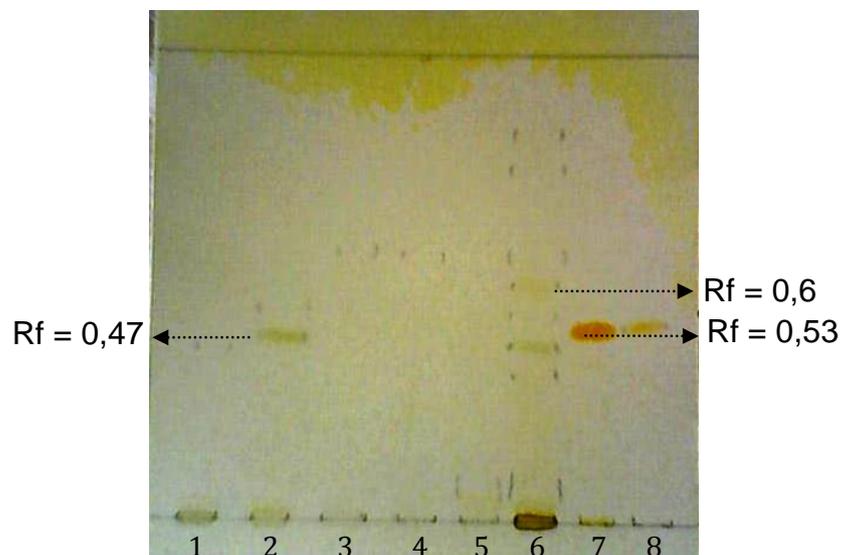


Figura 12 - Cromatograma em camada delgada das frações obtidas por CCD preparativa comparadas com a fração alcaloídica original E (6), uleína (7) e ioimbina (8) revelado com Dragendorff. Eluente: hexano/acetato de etila/metanol/dietilamina (5,5:3,5:0,8:0,2 v/v).

6.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi possível observar após a interpretação dos cromatogramas obtidos por CLAE que as frações alcaloídicas obtidas dos extratos etanólicos das amostras Q e E possuem cromatogramas diferentes evidenciando a diferença da constituição das amostras (Figura 13), indicando a probabilidade de se tratarem de espécies diferentes.

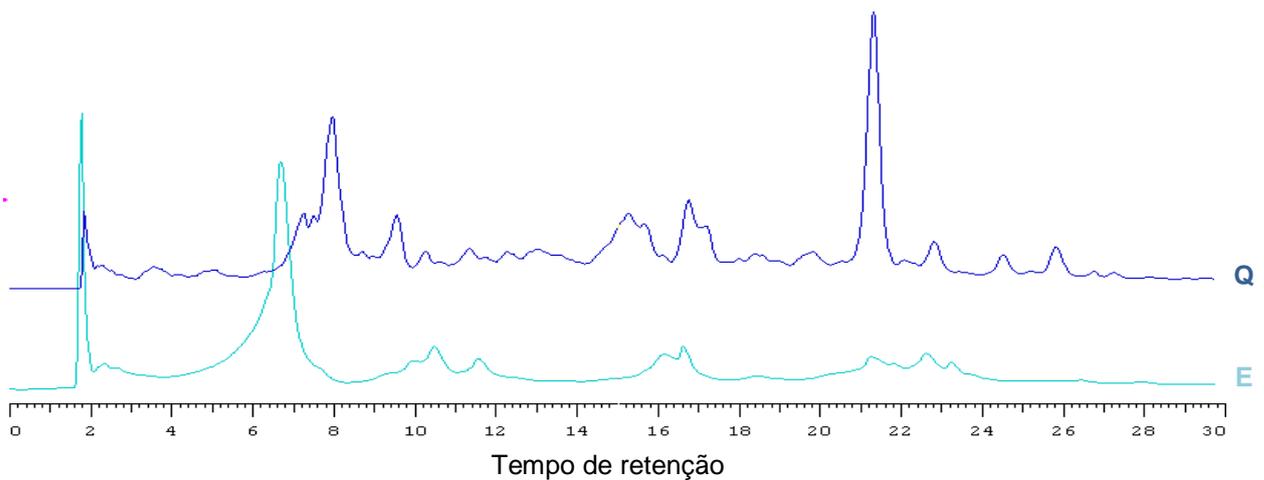


Figura 13 - Cromatograma de alta eficiência mostrando a análise comparativa das frações alcalóidicas do extrato etanólico de E e Q.

Em 2000, França et al., em estudos com os extratos da casca de *Plumeria lancifolia*, demonstraram a presença dos alcalóides indólicos uleína e (+)-demetoxiaspidospermina. Apesar de já se ter esclarecido a diferença entre os gêneros *Himatanthus* e *Plumeria*, diversos trabalhos ainda referem-se ao de França et al (2000) como isolamento de uleína a partir de *Himatanthus* e não de *Plumeria*, mostrando que a confusão entre os dois gêneros persiste, inclusive no meio científico.

A tentativa de se trabalhar inicialmente apenas com amostras obtidas no mercado foi prejudicada, uma vez que não foi possível caracterizar nenhuma delas como sendo realmente *Himatanthus lancifolius*, o que pode ser evidenciado comparando-se, por CCD e CLAE, uma amostra autenticada do vegetal, obtida junto à EMBRAPA, com as amostras comerciais. Este fato chama a atenção para o problema da falta de controle de qualidade das plantas medicinais disponíveis no mercado, já registrado na literatura (VEIGA JR, 2005).

Após a comparação dos cromatogramas obtidos das frações alcalóidicas dos extratos aquoso e etanólico da amostra E com a uleína, pode-se observar picos, com tempo de retenção (RT), semelhantes ao da substância, que é de 16,11min (Figura 14). Na fração alcalóidica do extrato aquoso tem-se um pico com RT de 16,32min (Figura 15) e na fração alcalóidica do extrato etanólico outro com 16,61min (Figura 16). Quando os espectros de UV correspondentes a esses picos são comparados, verifica-se uma correlação de 0,9762 entre os espectros do pico da

fração alcaloídica do extrato etanólico e o da uleína, já para o pico da fração alcaloídica do extrato aquoso a correlação é de 0,8718 (Figura 17).

Apesar da correlação do espectro do pico de tempo de retenção (RT) 16,61min da fração alcaloídica do extrato etanólico ser acima de 0,95, não se pode ainda afirmar tratar-se do alcalóide uleína; essa correlação pode se dar devido a existência de cromóforos na estrutura da substância semelhantes à uleína, ou seja de alcalóides com núcleo indólico com grupos substituintes diferentes (Figura 3).

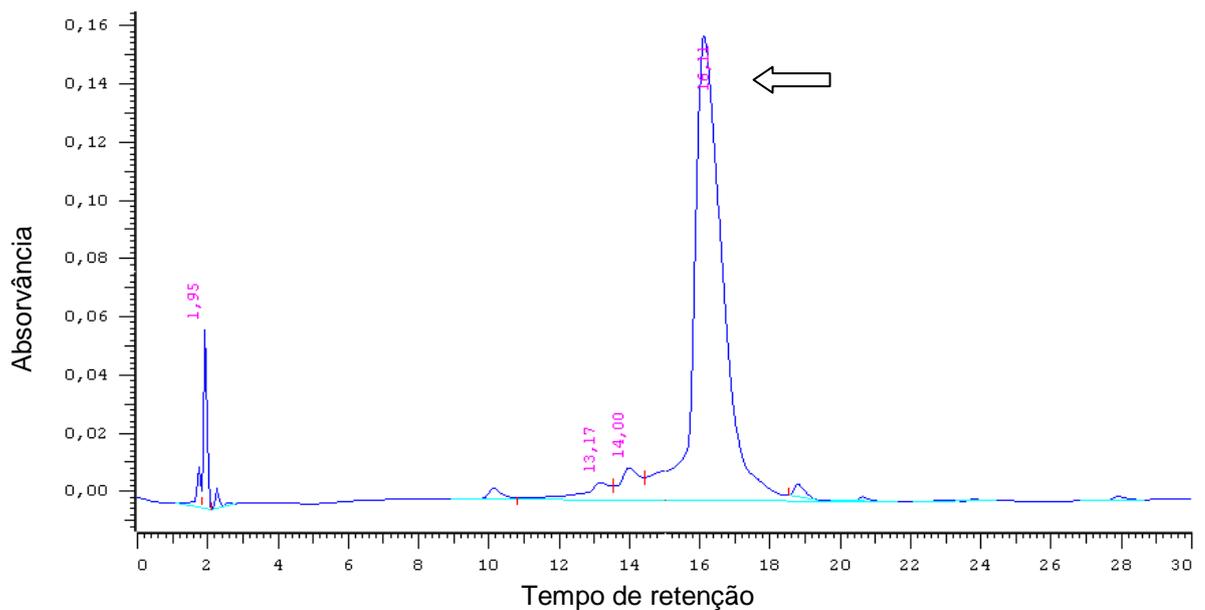


Figura 14 - Cromatograma de alta eficiência da uleína registrado a 250nm observando-se uma absorção máxima (~0,16 AU) no tempo de retenção 16,11min.

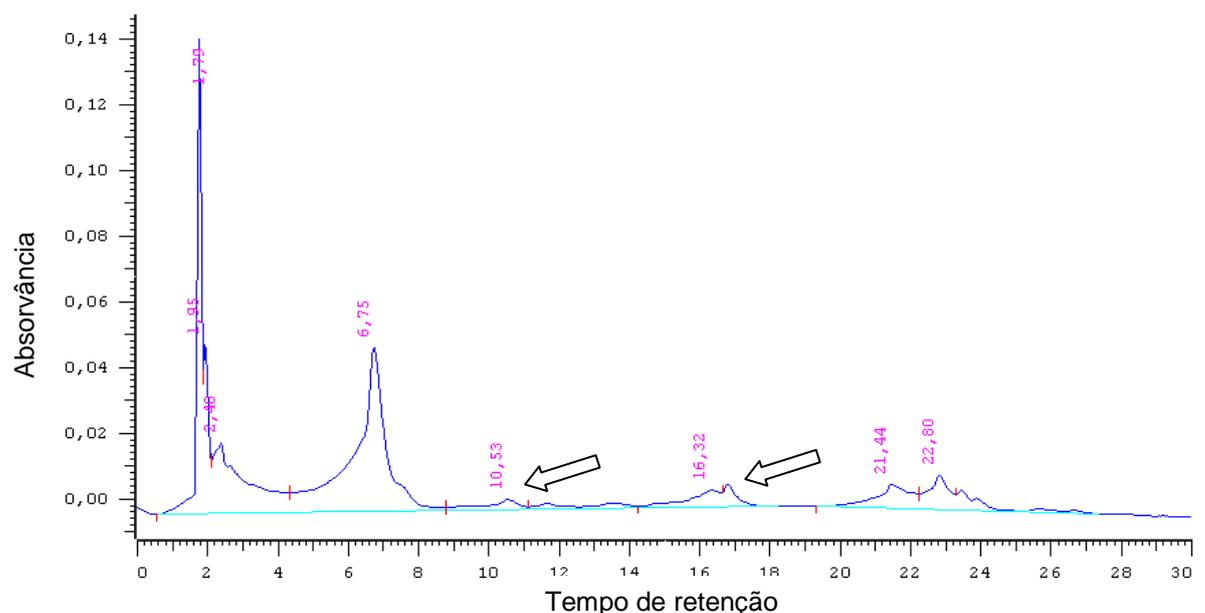


Figura 15 - Cromatograma de alta eficiência da fração alcaloídica do extrato aquoso de E registrado a 250nm onde se observam absorções máximas a 10,53min e 16,32min.

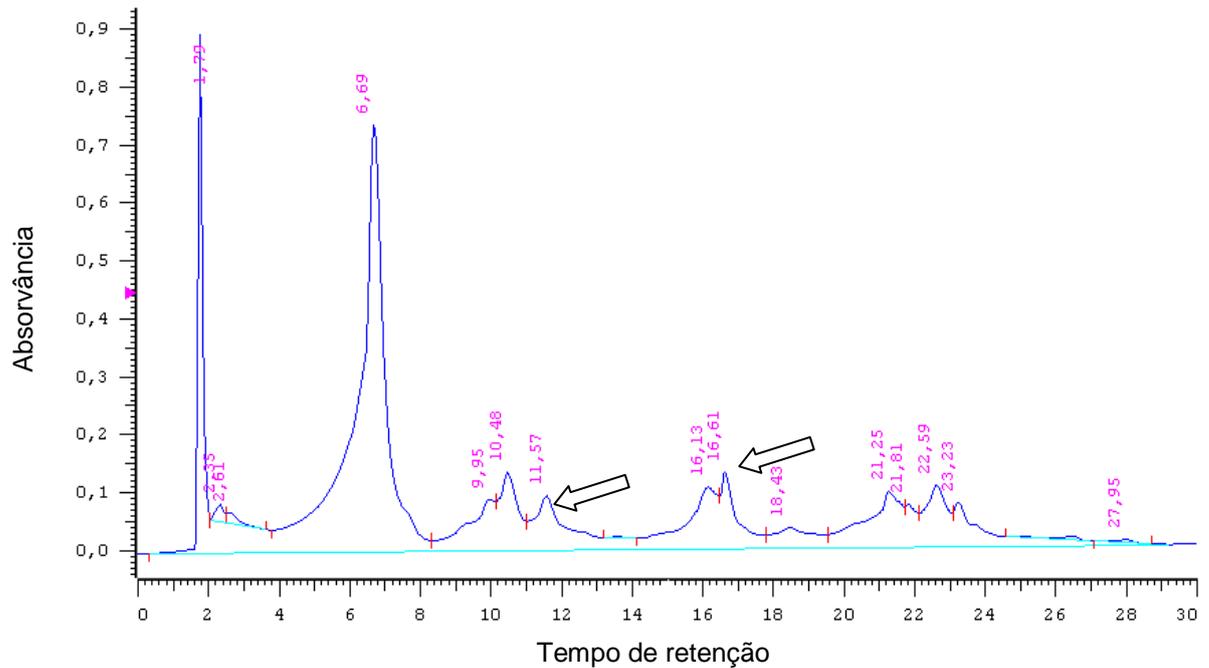


Figura 16 - Cromatograma de alta eficiência da fração alcaloídica do extrato etanólico de E registrado a 250nm onde se observam absorções máximas a 11,57min e 16,61min.

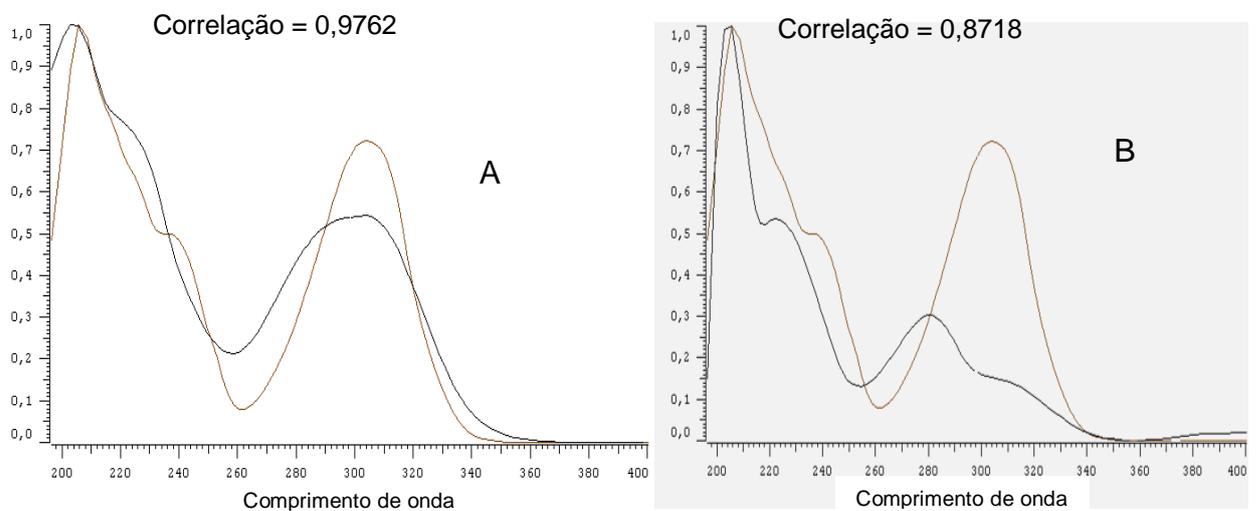


Figura 17 - Sobreposição dos espectros dos picos de tempo de retenção 16,11min da uleína (.....) e da fração alcaloídica dos extratos: 16,61min do (→) etanólico (A) e 16,32min do aquoso (B) da amostra E.

O mesmo procedimento se aplicou a fim de se verificar a presença de ioimbina na amostra E. Assim pode-se observar os respectivos tempos de retenção: 11,87min para ioimbina (Figura 18), 10,53min na fração alcaloídica do extrato aquoso (Figura 15) e a 11,57min na fração alcaloídica do extrato etanólico (Figura 16). No entanto, quando os espectros de UV são comparados pelo equipamento verifica-se uma correlação de - 0,5844 entre o espectro do pico da fração alcaloídica

do extrato aquoso e o da ioimbina e, uma correlação de 0,8728 ente o espectro do pico da fração alcaloídica do extrato etanólico e o da ioimbina (Figura 19), indicando que nenhum dos picos se trata do alcalóide em questão.

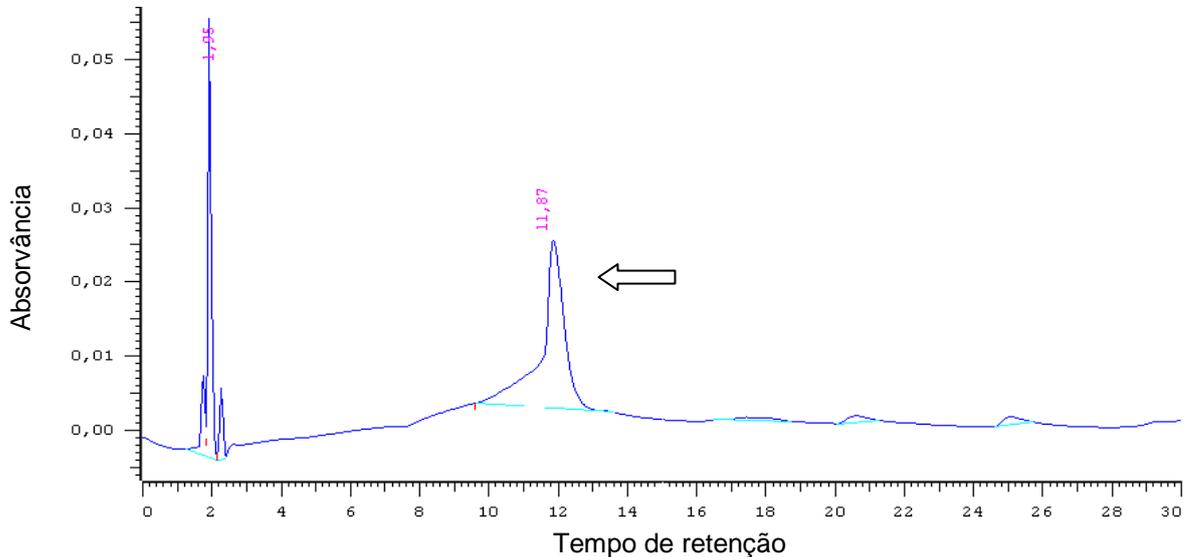


Figura 18 - Cromatograma de alta eficiência, a 250nm, da ioimbina observando-se a absorção máxima a 11,87min.

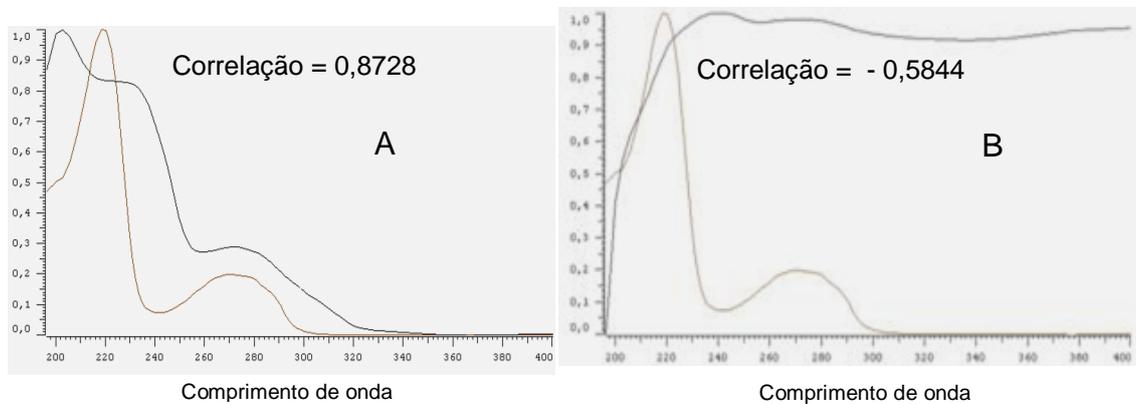


Figura 19 - Sobreposição dos espectros dos picos de tempo de retenção, 11,87min da ioimbina (—) e da fração alcaloídica dos extratos: 11,57min do (→) etanólico (A) e 10,53min do aquoso (B) da amostra E.

As frações 1, 2, 3, 4 e 5 obtidas por CCD preparativa foram submetidas à análise por CLAE, comparando-se os cromatogramas das frações com os picos da uleína e da ioimbina (Figura 20), apenas a fração 2 possui picos com tempos de retenção próximos aos apresentados pelos alcalóides; o que justifica a comparação dos espectros de UV desses picos.

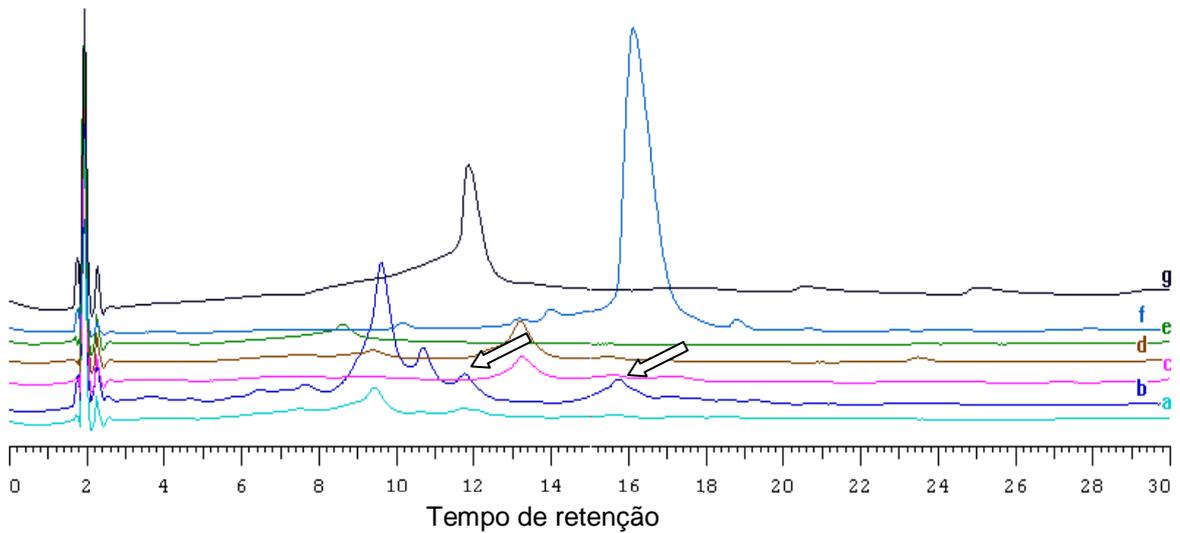


Figura 20 - Comparação dos cromatogramas de alta eficiência a 250nm das frações 1(a), 2 (b), 3 (c), 4(d) e 5(e) obtidas por CCD preparativa, com a uleína (f) e a ioimbina (g).

Quando se comparam os tempos de retenção de picos da fração 2 (Figura 21) com os tempos da uleína (Figura 14) e ioimbina (Figura 18) pode se verificar uma proximidade entre o pico com RT de 15,73min na fração 2 com o de 16,11min da uleína e o de 11,76min também na fração 2 com o 11,87min da ioimbina. No entanto, quando os espectros de UV são comparados pelo equipamento verifica-se uma correlação de, respectivamente, 0,7231 e de 0,7712 entre os espectros dos picos considerados, indicando não tratarem-se das mesmas substâncias.

Como pode se observar pelos dados obtidos através de CLAE (Figuras 20 e 21), a fração 2 não possui pureza que viabilize a sua utilização para a padronização do extrato aquoso de *H. lancifolius*.

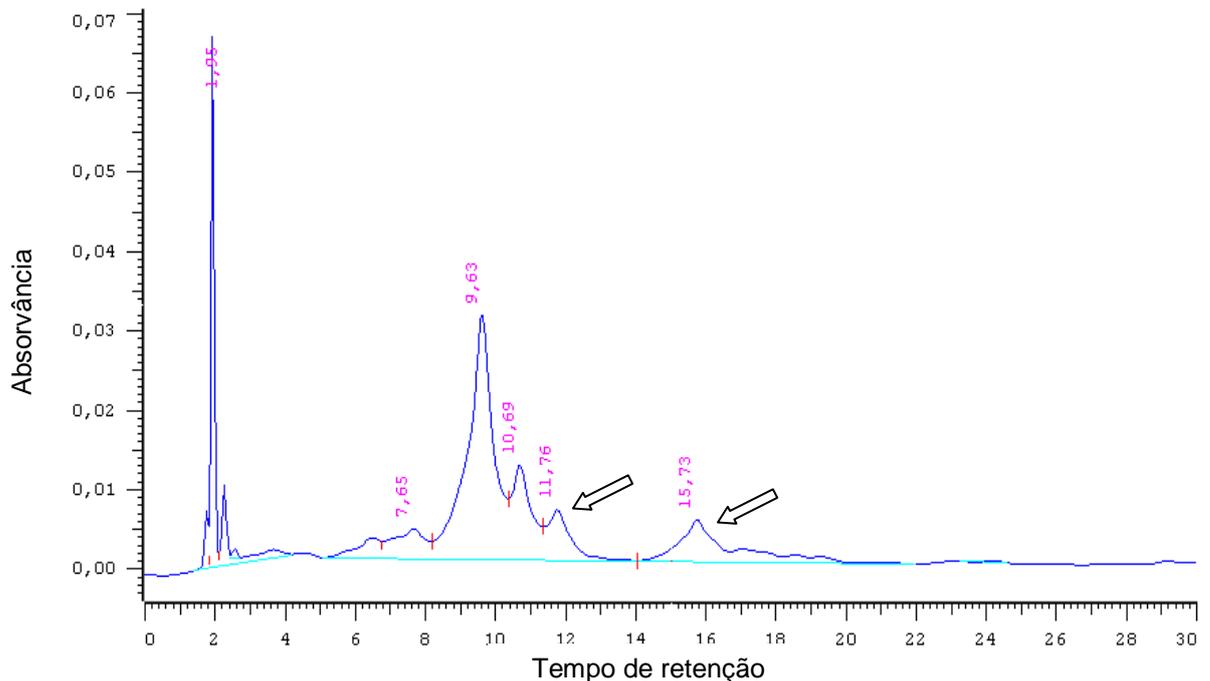


Figura 21 - Cromatograma de alta eficiência, a 250nm, da fração 2 obtida por CCD preparativa onde se observam as absorções máximas a 11,76min e 15,73min.

Apesar de trabalhos como os de França et al. (2000), Baggio et al. (2005), Rattmann et al. (2005), Nardim, et. al. (2006) e Souza et al. (2007) já terem reportado a presença do alcalóide uleína e o trabalho de Lopes (2008) relatar o isolamento do alcalóide ioimbina em *Himatanthus lancifolius*, as análises por CLAE aqui reportadas não evidenciam a presença destes alcalóides nas amostras pesquisadas, mas sim de substâncias contendo cromóforos idênticos. Talvez isso se deva ao metabolismo do vegetal que pode variar de acordo com as diferentes localidades de crescimento da planta, o que interfere na produção de metabólitos secundários e pode explicar a ausência destes alcalóides na amostra de *H. lancifolius* coletada na Fazenda do Mocambo da EMBRAPA no Pará.

.Como não foi possível isolar nenhum constituinte químico com grau de pureza satisfatório, decidiu-se desenvolver um método espectrofotométrico para padronizar o extrato aquoso com base nos alcalóides totais. Matérias-primas vegetais que raramente apresentam substâncias químicas isoladas e a disponibilidade de um número reduzido de substâncias químicas de referência para comparação com as mesmas dificulta a quantificação de substâncias ativas em fitoterápicos. Diante dessa situação, o uso de extratos padronizados com base em

grupos específicos de princípios ativos visa garantir a homogeneidade química do produto lote a lote, para o controle da qualidade (BAUER, 1998; CAPASSO, 2000 apud BARA, 2004).

6.9 Validação de método espectrofotométrico para a quantificação dos alcalóides totais

Ao se verificar a ocorrência de um máximo de absorção em 281nm na fração alcaloídica oriunda do extrato aquoso (Figura 22) optou-se por adotar a ioimbina como padrão externo para o processo de validação, pois além de ser um alcalóide com núcleo indólico e ser possível adquiri-lo no mercado na forma de substância química de referência (SQR) possui entre os máximos de absorção, que a caracterizam, o de 281nm (OLIVEIRA, 1994) coincidente com o da fração estudada.

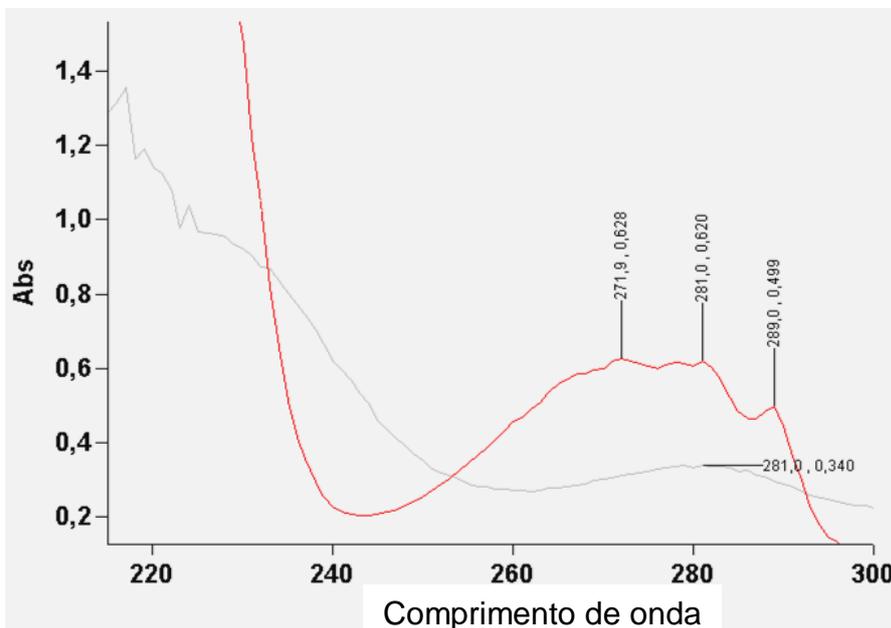


Figura 22 – Espectro de UV obtido para a fração alcaloídica do extrato aquoso (—) e para o cloridrato de ioimbina (—) evidenciando os máximos de absorção e suas respectivas absorvidades. Nota-se a absorção máxima a 281nm para ambas as amostras.

6.9.1 CRITÉRIOS PARA VALIDAÇÃO

6.9.1.1 Seletividade

Na figura 23 pode-se observar o espectro de UV obtido para a fração alcaloídica do extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius* (30µg/mL), para o cloridrato de ioimbina (22µg/mL) e para o solvente metanol na faixa compreendida entre 200 a 400nm, em detalhe 240 a 300nm, evidenciando o máximo de absorção em 281nm apenas para a ioimbina e a fração alcaloídica. Com isso, pode-se confirmar que neste comprimento de onda é possível quantificar seletivamente a substância de referência e os alcalóides contidos na fração investigada, mesmo na presença de outros componentes.

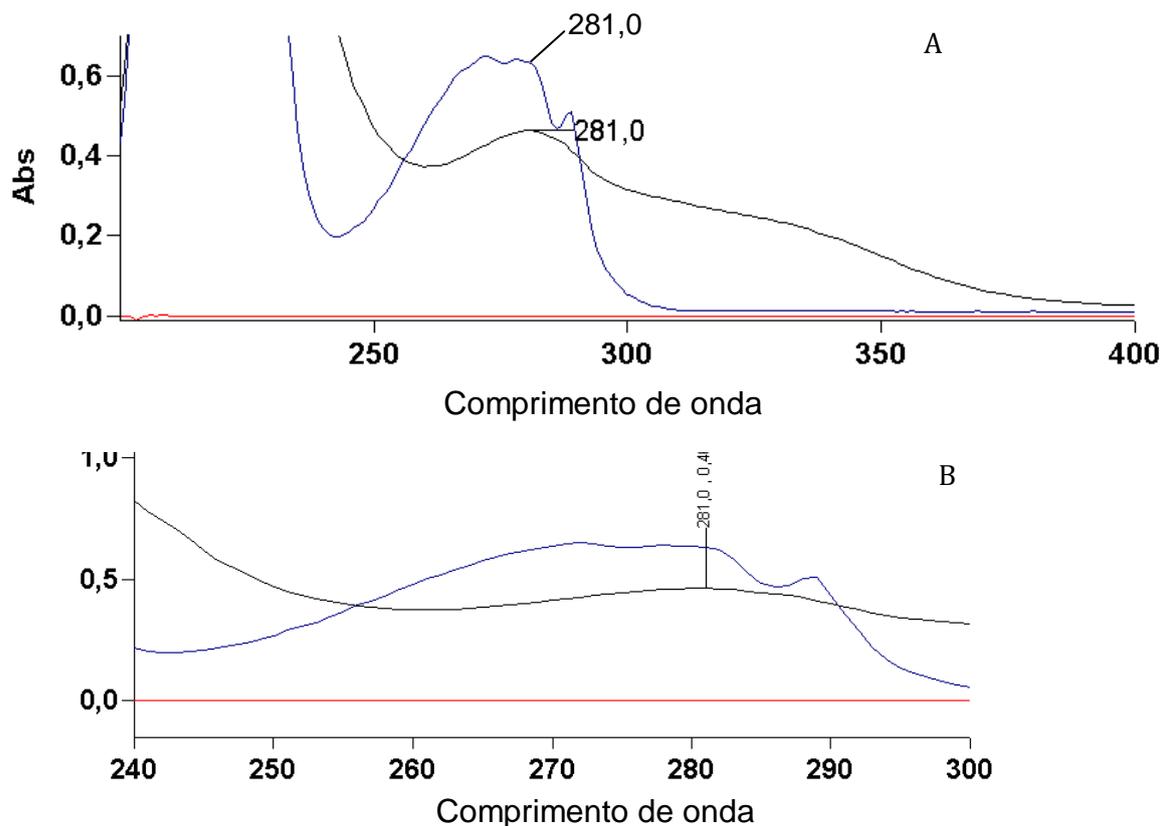


Figura 23- Seletividade do método desenvolvido com ioimbina, como referência, 22µg/mL (—), em relação à fração alcaloídica do extrato aquoso de *H. lancifolius* a 30 µg/mL (—) e ao solvente metanol (—); em varredura de 200nm a 400nm (A) e em detalhe de 240nm a 300nm (B).

6.9.1.2 Linearidade

O método espectrofotométrico apresentou linearidade em 281nm para as concentrações analisadas. A linearidade do método, juntamente com o coeficiente de determinação (R²) e de correlação (r) para a ioimbina, está expressa na Figura 24 e as absorções obtidas para as diversas concentrações são apresentadas na Tabela 3.

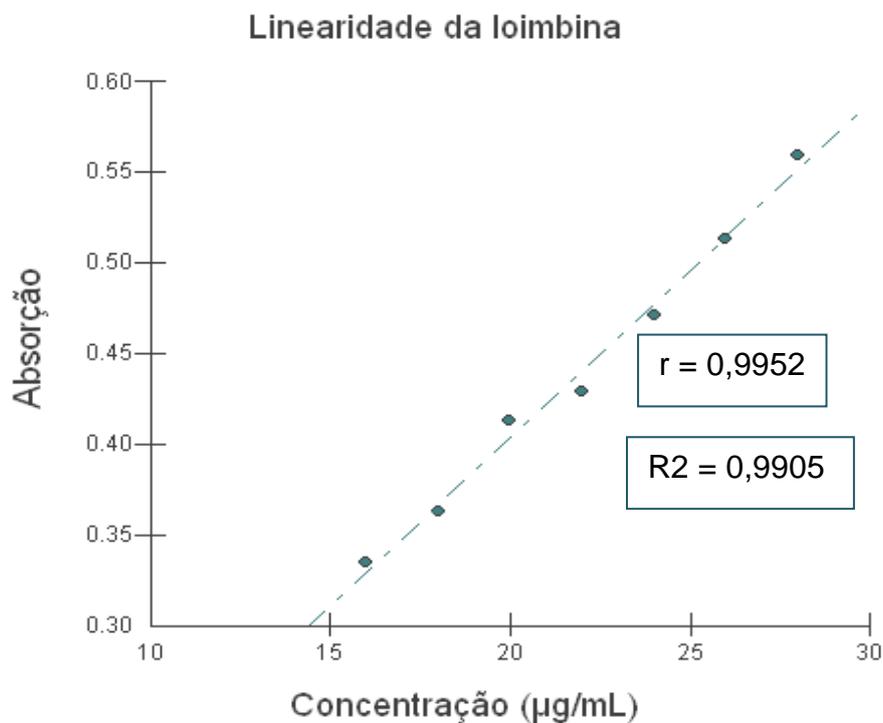


Figura 24 - Representação gráfica da linearidade do método para as soluções de referência com ioimbina a 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 µg/mL.

Tabela 3 - Resultados do teste de linearidade do método desenvolvido por espectrofotometria no UV utilizando-se soluções de ioimbina como referência

| Concentração teórica (µg/mL) | Número de repetições | Absorções |
|------------------------------|----------------------|-----------|
| 16 | 5 | 0,335 |
| 18 | 5 | 0,363 |
| 20 | 5 | 0,413 |
| 22 | 5 | 0,429 |
| 24 | 5 | 0,471 |
| 26 | 5 | 0,513 |
| 28 | 5 | 0,559 |

Apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração, pois modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico, ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração podem oferecer um bom coeficiente de correlação (RIBEIRO, et al., 2008). Por isso realizou-se a análise de resíduos da linearidade onde se pode observar a distribuição uniforme, média zero, variância constante (homocedastidade) e ausência de amostras atípicas (figura 25) indicando que a curva está bem ajustada.

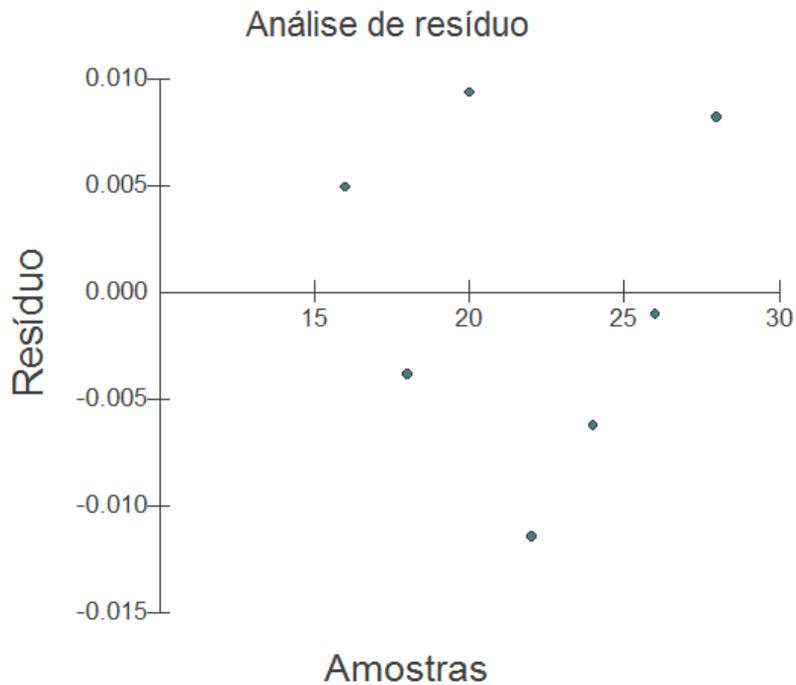


Figura 25 - Representação gráfica dos resíduos da linearidade do método para as soluções de referência com ioimbina a 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 $\mu\text{g/mL}$.

6.9.1.3 Intervalo

O coeficiente de determinação obtido foi de $R^2 = 0,9905$, comprovando-se a adequação do método ao intervalo avaliado (16 – 28 $\mu\text{g/mL}$).

6.9.1.4 Curva de calibração

A curva analítica, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação de Pearson (r) para a ioimbina está expressa na Figura 26 e as absorções obtidas para as diversas concentrações são apresentadas na Tabela 4.

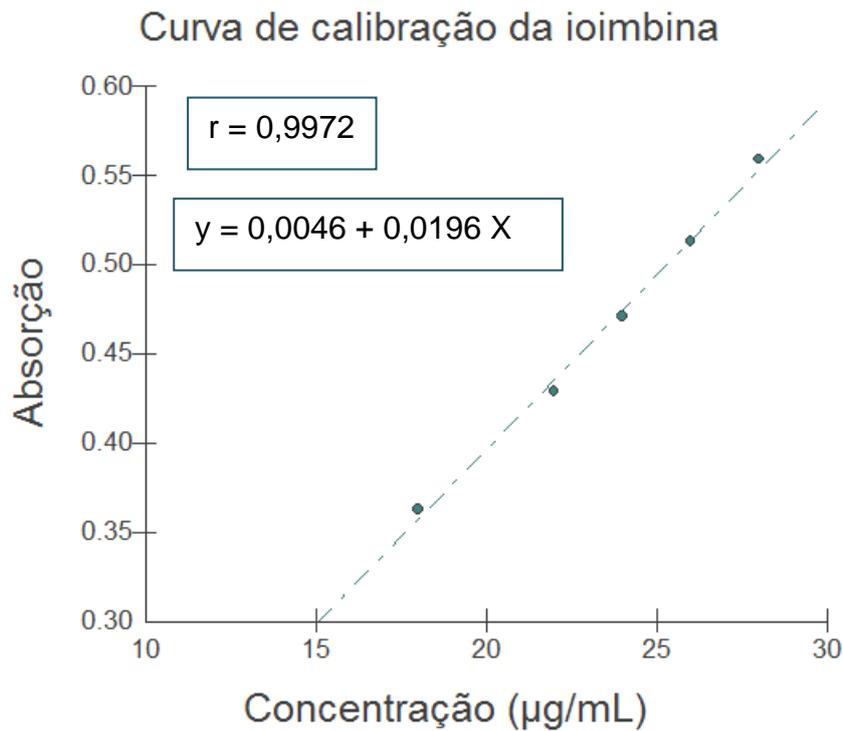


Figura 26 - Representação gráfica da curva de calibração obtida com soluções de ioimbina a 18, 22, 24, 26 e 28 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 - Resultados da curva de calibração obtida por espectrofotometria no UV utilizando-se soluções de ioimbina como referência

| Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$) | Número de determinações | Absorções |
|---|--------------------------------|------------------|
| 18 | 5 | 0,363 |
| 22 | 5 | 0,429 |
| 24 | 5 | 0,471 |
| 26 | 5 | 0,513 |
| 28 | 5 | 0,559 |

6.9.1.5 Precisão e exatidão

Os dados da repetibilidade (intra-corrída), precisão intermediária (inter-corrídas) e exatidão estão na Tabela 5 onde se pode observar que os valores de desvio padrão relativo encontraram-se compreendidos entre 0,19% e 2,09% e que os valores de exatidão encontrados estão entre 98% e 102,90%. A ANVISA regulamenta que a variação da precisão não pode ultrapassar 5% e para a exatidão, não deve ser inferior a 95% (BRASIL, 2003).

Esses dados confirmam que o método proposto para a quantificação de alcalóides totais do extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius* por espectrofotometria no UV encontra-se em conformidade com a legislação vigente e apresenta resultados confiáveis.

Tabela 5 - Resultados da verificação de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método espectrofotométrico no UV desenvolvido para o doseamento de alcalóides totais contidos no extrato aquoso de *H. lancifolius*.

| Ensaio | Concentração teórica (µg/ml) | N | C (µg/ml) | DP | DPR (%) | E (%) |
|------------------------------|------------------------------|---|-----------|-------|---------|--------|
| Repetibilidade | 16 | 3 | 15,698 | 0,030 | 0,19 | 98,00 |
| | 20 | 3 | 19,864 | 0,181 | 0,90 | 99,32 |
| | 28 | 3 | 27,724 | 0,392 | 1,41 | 99,01 |
| Precisão intermediária Dia 1 | 16 | 3 | 16,448 | 0,205 | 1,25 | 102,80 |
| | 20 | 3 | 20,580 | 0,257 | 1,25 | 102,90 |
| | 28 | 3 | 28,373 | 0,245 | 0,86 | 101,33 |
| Precisão intermediária Dia 2 | 16 | 3 | 16,213 | 0,339 | 2,09 | 101,33 |
| | 20 | 3 | 20,345 | 0,054 | 0,27 | 101,72 |
| | 28 | 3 | 28,391 | 0,271 | 0,96 | 101,39 |

C = Concentração média das N determinações; DP = Desvio padrão; DPR(%) = Desvio Padrão Relativo; E(%) = Exatidão.

6.9.1.6 Limite de detecção

O valor do limite de detecção estimado pela equação 3 é de 4,59µg/mL.

$$LD = \frac{0,03 \times 3}{0,0196} = 4,59 \mu\text{g/mL}$$

6.9.1.7 Limite de quantificação

O valor do limite de quantificação obtido pela equação 4 é de 15,306 µg/mL.

$$LQ = \frac{0,03 \times 10}{0,0196} = 15,306 \text{ µg/mL}$$

6.9.1.8 Robustez

Não houve variação do espectro obtido para as soluções de ioimbina preparadas com os solventes de marcas diferentes como pode se observar nas Figuras 27, 28 e 29, onde o máximo de absorção considerado no método se manteve em 281nm. Os dados encontram-se inseridos na Tabela 6.

Os dados receberam tratamento estatístico pela análise de variância ANOVA, onde obteve-se $p = 0,5694$ evidenciando que não há diferença estatística significativa, pois $p > 0,05$, demonstrando assim ser um método robusto.

Tabela 6 - Resultados da avaliação da robustez do método espectrofotométrico no UV desenvolvido para o doseamento de alcalóides totais contidos no extrato aquoso de *H. lancifolius*

| Concentração teórica (µg/ml) | Solvente | N | C (µg/ml) | Absorção |
|------------------------------|----------|---|--------------|----------|
| 16 | 1 | 3 | 16,448 | 0,293 |
| 20 | | 3 | 20,580 | 0,373 |
| 28 | | 3 | 28,373 | 0,523 |
| 16 | 2 | 3 | 16,217 | 0,261 |
| 20 | | 3 | 19,651 | 0,315 |
| 28 | | 3 | 28,141 | 0,449 |

C = Concentração média das N determinações

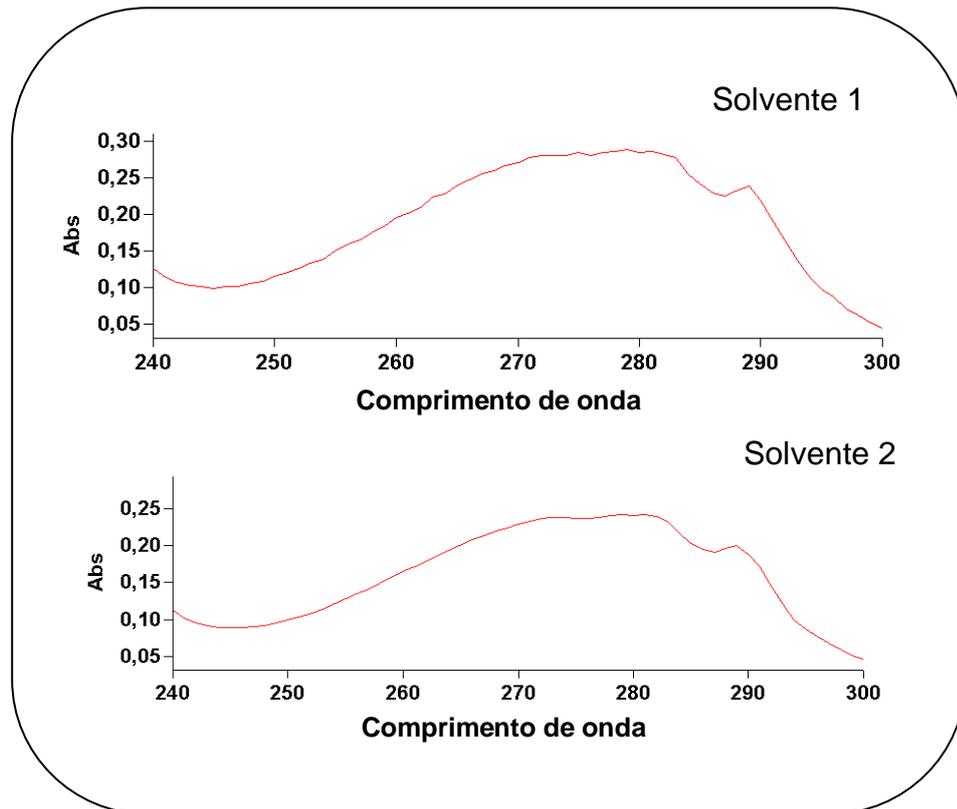


Figura 27 - Representação da robustez do método espectrofotométrico no UV da ioimibina a 16µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes.

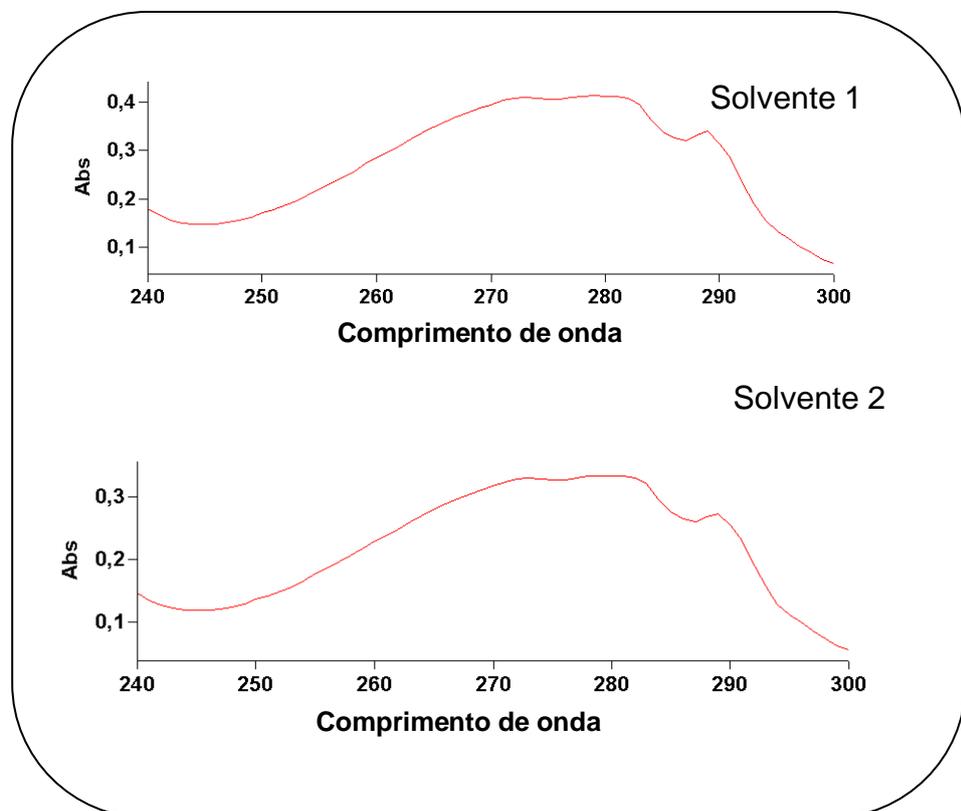


Figura 28 - Representação da robustez do método espectrofotométrico no UV da ioimibina a 20µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes.

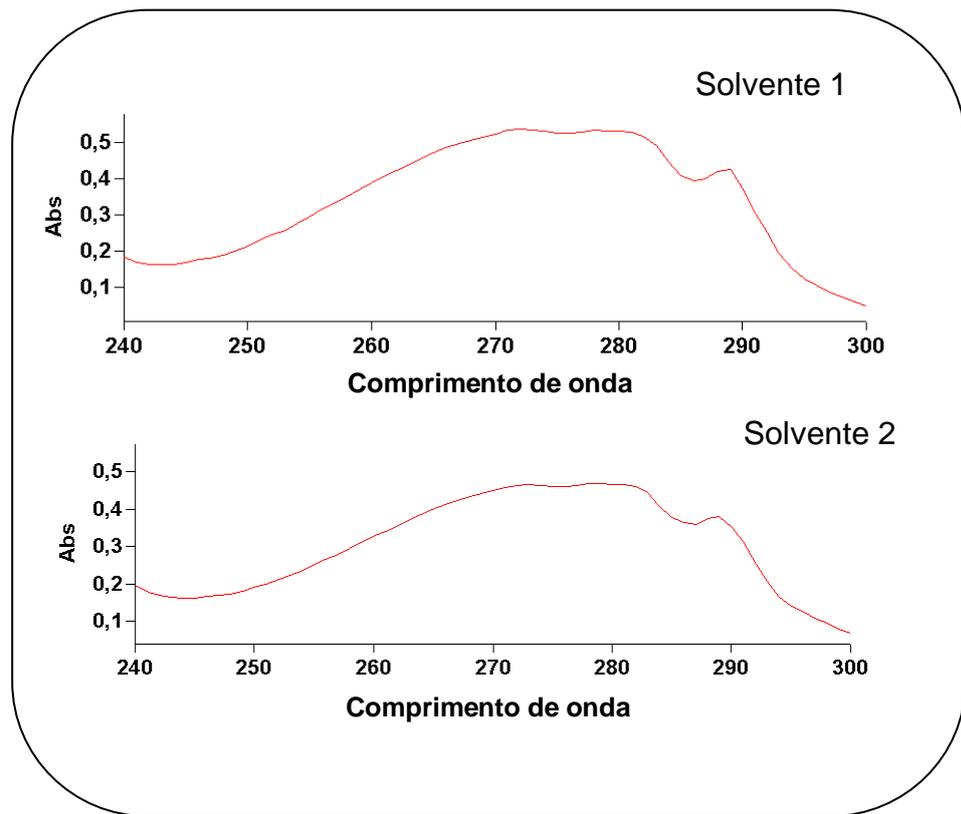


Figura 29 - Representação da robustez do método espectrofotométrico no UV da ioimbina a 28µg/mL, dissolvidos com solventes de procedência diferentes.

6.10 Quantificação dos alcalóides totais presentes no extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius*

Após a leitura em triplicata da solução metanólica de 30µg/mL da fração alcaloídica do extrato aquoso em espectrofotômetro a 281nm, obteve-se uma absorção média de 0,462. Utilizando-se a equação da reta ($y = 0,0046 + 0,0196 X$), pode-se calcular a quantidade de alcalóides totais presentes na amostra, os resultados se encontram condensados na tabela 7.

$$y = 0,0046 + 0,0196 X \quad (5)$$

$$0,462 = 0,0046 + 0,0196X$$

$$0,462 - 0,0046 = 0,0196X$$

$$X = 23,337 \mu\text{g/mL} = 77,79\%$$

Tabela 7 – Rendimento em alcalóides totais relativo ao pó da casca de *H. lancifolius* empregado para preparação do extrato aquoso seco (I), em relação ao extrato aquoso seco (II) e em relação a fração alcaloídica obtida (III).

| Material | Pó | Extrato aquoso seco | Fração alcaloídica | Alcalóides totais |
|----------|---------|---------------------|--------------------|-------------------|
| Peso | 25000mg | 9549mg | 26,74mg | 20,80mg |
| I | 100% | ————— | | 0,0832% (832ppm) |
| II | | 100% | ————— | |
| III | | | 100% | 77,79% |

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Através da caracterização física e química da droga vegetal (casca) e do derivado vegetal (extratos etanólico e aquoso), foi possível obter especificações farmacobotânicas além de parâmetros espectroscópicos e cromatográficos específicos para o controle de qualidade da espécie vegetal em estudo.

Foi possível caracterizar morfológicamente e microquimicamente as cascas de *H. lancifolius*, o que se mostra de extrema importância, para caracterizar melhor o vegetal investigado, já que ainda se confundem os gêneros *Plumeria* e *Himatanthus*.

O método de quantificação proposto foi validado, pois apresenta alta seletividade a 281nm para a fração alcaloídica do extrato aquoso de *Himatanthus lancifolius* o que lhe confere confiabilidade para a quantificação dos alcalóides totais do vegetal. Além de ser um método robusto, segundo parâmetros exigidos pela legislação vigente, a correlação entre as absorvâncias e concentração segundo a equação obtida confirma se tratar de um método linear. O método de quantificação por espectrofotometria no UV, a 281nm, se mostra preciso e exato além de acessível e de fácil execução, o que tornou possível a quantificação dos alcalóides totais presentes no extrato aquoso do material vegetal coletado no Pará em janeiro de 2009.

Espera-se que as características e métodos definidos nesse trabalho contribuam com futuras identificações e para o controle de qualidade da matéria prima e de fitoterápicos a base do vegetal investigado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A.C.F. et al. Monograph of *Himatanthus succuba*, a plant of Amazonian folk medicine. **Pharmacognosy Reviews**. Vol 1, Issue 2, 2007.
- BAGGIO, C. H. et al. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med** .71, p.733-738, 2005.
- BARA, M. T. F., CIRILO, H. N., OLIVEIRA, V. Determinação de Ginkgoflavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados. **Revista eletrônica de farmácia**. v. 1 (1), p. 1-7, 2004.
- BARBOSA, W. L. R. et al. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Belém: UFPA, 2001. Disponível em: www.propesp.ufpa.br/revistaic/textoscientificos.htm. Acessado em 09 de fevereiro de 2009.
- BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug Standards be achieved? **Drug Information Journal**. v. 32, p. 101-110, 1998.
- Brasil. DECRETO nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [HTTP://e-legis.anvisa.gov.br](http://e-legis.anvisa.gov.br).
- Brasil. PORTARIA MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [HTTP://e-legis.anvisa.gov.br](http://e-legis.anvisa.gov.br).
- Brasil. RDC nº48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [HTTP://e-legis.anvisa.gov.br](http://e-legis.anvisa.gov.br).
- Brasil. RE nº899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [HTTP://e-legis.anvisa.gov.br](http://e-legis.anvisa.gov.br).
- CAPASSO, R., et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, ano v, nº11, junho de 2007.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15 (2): 314-319, 2008.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil: e das exóticas cultivadas**. Vol 1. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2ª ed. Vol. III. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

CRONQUIST, A. **A integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2ª ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

CRUZ, G. L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Civilização Brasileira S. A., 1985.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, uma campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **INFARMA**, v. 16, nº 9-10, 2004.

DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Plantas Medicinais. Fármacos derivados de plantas. In: SILVA, P., **Farmacologia**, 6ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.p. 134-145.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae s. l. **The botanical review** 66: 1-56, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed., parte I, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA., parte I, 1926.

FARIAS, M. R. et al, P.R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de farmácia**, Vol. 1, nº 2, 73-82, 1985.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia** 71, p.208-210, 2000.

GIULIETTI, A. M. et al, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation biology** 19(3):632-639,2005.

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Vol. 30, nº2, 374-381, 2007.

INMETRO DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Nova York: Mc-Graw-Hill Book Co. Inc, 1940.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LARROSA, C. R. R.; DUARTE, M. R. Contribuição ao estudo anatômico do caule de *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Mull. Arg.) Woodson, Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15 (2), p. 110-114, 2005.

LARROSA, C. R. R.; DUARTE, M. R. Anatomia foliar e caulinar de *Forsteronia glabrescens*, Apocynaceae. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 25 (1), p. 28-34, 2006.

LOPES, J. F. **Ioimbina e uleína isolados de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae**. 2008 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em: dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/.../Juliano%20Ferreira%20Lopes.pdf Acessado em 22 de fevereiro de 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, vol. 25, nº 3, p. 429-438, 2002.

MATOZINHOS, C. N.; KONNO, T. U. P. Apocynaceae s. l. na reserva biológica na represa do Grama, descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 59 (1). p. 087- 098, 2008.

MENGUE, S. S. et al. Especies vegetales utilizadas por embarazadas con el objeto de provocar La menstruación (Encuesta a siete ciudades de Brasil). **Acta Farmacêutica Bonaerense**. V. 16, nº 2, p.251- 8, 1997.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 11 (1): 21-35, 2001.

MOREIRA, F. F. et al . Palinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na Restinga de Carapebus, Carapebus, RJ, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 18, n. 4, Dec. 2004.

NARDIN, J. M. **Atividades biológicas da uleína**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em

<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/10181>. Acessado em 22 de fevereiro de 2009.

NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios. Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA, F. AKISUE, G. **Farmacobotânica: curso de identificação de drogas vegetais**. São Paulo: USP, 1979.

OLIVEIRA, A. J. B. **Estudo de quatro espécies do gênero *Aspidosperma* por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas**. 1994 Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1994. Disponível em: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha21388.htm>. Acessado em 22 de fevereiro de 2009.

Organização Mundial da Saúde. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines – Report of a WHO global survey. Genebra, 2005. 156p.

PINTO, L. N. Etnofarmácia no município de Igarapé-Miri – Pa. In: BARBOSA, W. L. R. (Org). **Etnofarmácia: Fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. Belém: NUMA/UFPA, 2009. Pag. 59-138.

PURVIS, M. J.; COLLIER, D. C.; WALLS, D. **Laboratories techniques in botany**. London: Butterwoths, 1964.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, nº 2, p. 57-69, 2001.

RATTMANN, Y.D. et al. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell.Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, p.268-275, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, vol.27, nº 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L., et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, nº 1, p. 164-171, 2008.

SOUZA, W. M. et al. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(2): 191-196, abril/junho, 2007.

SOUZA, W. M. **Estudo químico e das atividades biológicas dos Alcalóides indólicos de *himatanthus lancifolius* (muell. Arg.) Woodson, apocynaceae – (agoniada)**. 2008. 173f. Tese (Doutorado em Ciências

Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPINA, A. P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae – Plumericeae)**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000321956>.

VEIGA JR, V. F. PINTO, A. C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, Vol. 28, nº 3, 519-528, 2005.

WOODSON JR, R. E. **Studies in the Apocynaceae: An evaluation of the genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd.** Ann. Missouri Bot. Gard. 25: 193, 1938.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, Vol. 24, nº 1, 147-152, 2001.