

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA POR CLAE EM FASE REVERSA PARA A
DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Aspidosperma nitidum* Benth
(Apocynaceae).**

DANIEL CARDOSO SIMPSON

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIEL CARDOSO SIMPSON

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA POR CLAE EM FASE REVERSA PARA A
DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Aspidosperma nitidum* Benth
(Apocynaceae).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos
Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria de Meneses Pereira

MANAUS
2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

S613d Simpson, Daniel Cardoso

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE em fase reversa para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum* Benth(Apocynaceae) / Daniel Cardoso Simpson. – Manaus, 2013.

79f. il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–
Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria de Meneses Pereira

1. Plantas medicinais 2. Farmacopéia 3. Flora medicinal I. Santos, Pierre Alexandre dos (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 2007 581.19:633.88(043.3)

Esta dissertação foi submetida como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas.

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof^a. Dr^a. Débora Teixeira Ohana

.....
Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima

.....
Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos

*Dedico aos meus pais Sidney e Ivaneide e à minha esposa
Fernanda, pelo apoio incondicional durante todos esses anos,
pelo incentivo, pelo carinho, por não medirem esforços para
que eu concluísse com êxito mais esta etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me conduziu a este caminho, estando sempre ao meu lado e muitas vezes me reerguendo durante toda esta caminhada que chamamos de vida.

Ao professor Dr. Pierre Alexandre dos Santos pela orientação, pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo incentivo, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À professora Dr^a. Maria de Meneses Pereira pela coorientação, auxílio e pelos ensinamentos.

À professora Dr^a. Tatiane pela disposição e ajuda importantíssimas para a conclusão desse trabalho.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos.

“Portanto, eu vos digo: pedi e recebereis; procurai e encontrareis; batei e vos será aberto. Pois quem pede, recebe; quem procura, encontra; e, para quem bate, se abrirá. Será que algum de vós que é pai, se o filho pedir um peixe, lhe dará uma cobra? Ou ainda, se pedir um ovo, lhe dará um escorpião? Ora, se vós que sois maus, sabeis dar coisas boas aos vossos filhos, quanto mais o Pai do Céu dará o Espírito Santo aos que o pedirem! “

Lucas 11, 9-13

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas.

RESUMO

Aspidosperma nitidum Benth pertencente à Apocynaceae, conhecida popularmente como carapanaúba ou peroba, amplamente utilizada na região Amazônica, principalmente no alívio dos sintomas da malária, tendo como característica marcante do gênero a presença maciça de alcaloides indólicos. Apesar do uso em grande escala de plantas medicinais na medicina popular, problemas como identificação e padronização das espécies são bastante comuns. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a validação do método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, com o objetivo de determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*. O extrato etanólico foi obtido por maceração, e o extrato seco por liofilização. A avaliação da constituição química qualitativa do extrato etanólico de espécie demonstrou a presença de alcaloides. O método analítico foi desenvolvido em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos, utilizando sistema de separação em fase reversa. A validação do método analítico foi realizada por método de padronização interna, utilizando a 1,8-dihidroxi-antraquinona como padrão, com as curvas de calibração apresentando linearidade ($r^2 > 0,99$) em uma ampla faixa de concentração do extrato e do padrão, de 62,5 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ e de 15 a 500 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Na validação observou-se repetibilidade e reprodutibilidade acima de 95%, já que os valores de coeficiente de variação obtidos de ambos os testes estão abaixo de 5%. O método apresentou boa exatidão, a qual foi demonstrada pela recuperação média de 106% com o coeficiente de variação de 2,2%. Por tudo isso, o método cromatográfico desenvolvido e validado se mostrou simples, linear, preciso, reprodutível e exato, podendo ser utilizado, portanto, para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule *Aspidosperma nitidum*.

Palavras-chave: *Aspidosperma nitidum*, desenvolvimento, validação, CLAE.

ABSTRACT

Aspidosperma nitidum Benth belonging to the Apocynaceae, popularly known as carapanaúba or peroba, widely used in the Amazon region, especially in the relief of symptoms of malaria, having as striking feature of the gener the great presence of indol alkaloids. Despite the widespread use of herbal folk medicine, problems as identification and standardization of the species are quite common. In this context, the present study aimed at the development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography, in order to determine the chromatographic profile of the ethanol extract of the stem bark of *Aspidosperma nitidum*. The ethanol extract was obtained by maceration and dried extract by freeze. A qualitative evaluation of chemically ethanol extract species showed the presence of alkaloids. The methodology was developed in a liquid chromatograph with high efficiency photodiode array detector, using reverse phase separation system. The validation procedure was carried out by the method of internal standardization, using the 1.8-dihydroxiantraquinona as standard. The calibration curves showed linearity ($r^2 > 0.99$) in a wide range of concentration of the extract and standard, 62.5 to 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 15 to 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The test presented repeatability and reproducibility above 95%, since the coefficient of variation obtained from both assays are below 5%. The method showed good accuracy, which was shown by average recovery of 106% with a coefficient of variation of 2,2%. For all that, the chromatographic method developed and validated proved simple, linear, reproducible and accurate, It can be used therefore for determining the chromatographic profile of the ethanol extract of the stem bark *Aspidosperma nitidum*.

Keywords: *Aspidosperma nitidum*, development, validation, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caule multissulcado e folhas oblongas de <i>Aspidosperma nitidum</i>	20
Figura 2 - Alcaloides indólicos encontrados em <i>Aspidosperma nitidum</i>	25
Figura 3 – Esteróides e triterpenos encontrados em <i>Aspidosperma nitidum</i>	25
Figura 4 – Componentes de um cromatógrafo a líquido moderno.....	28
Figura 5 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Aspidosperma nitidum</i> , na concentração de 1mg/mL. 4 µL do extrato foi injetado no cromatógrafo a líquido, equipado com uma coluna C-18, utilizando água e acetonitrila como fases móveis, com fluxo de 0,8 mL/min.....	62
Figura 6 – Perfil cromatográfico da 1,8-dihidroxi-antraquinona, utilizada como padrão.....	63
Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>A. nitidum</i> , contaminado com a 1,8-dihidroxi-antraquinona, utilizada como padrão.....	64
Figura 8 – curva padrão da área do pico 1 do extrato etanólico de <i>A. nitidum</i>	65
Figura 9 – curva padrão da área do pico do padrão 1,8-dihidroxi-antraquinona.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diversas utilizações de <i>Aspidosperma nitidum</i>	21
Quadro 2 - Requisitos a serem validados em um cromatógrafo líquido.....	38
Quadro 3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	39
Quadro 4 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.....	44
Quadro 5 - Resumo da determinação da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.....	45
Quadro 6 – Diferentes métodos de eluição utilizados.....	56
Quadro 7 - Constituição química do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Aspidosperma nitidum</i>	61
Quadro 8 – Gradiente de eluição validado.....	62
Quadro 9 - Áreas do pico 1 do extrato, em seis concentrações diferentes obtidas em três diferentes dias.....	65
Quadro 10 - Áreas do pico do padrão 1,8-dihidroxi-antraquinona, em seis concentrações diferentes obtidas em três diferentes dias.....	66
Quadro 11 - Parâmetros de linearidade para o padrão e o pico 1 presente na solução extrativa do extrato etanólico de <i>A. nitidum</i>	68
Quadro 12 - Ensaio de repetibilidade do extrato, na concentração de 1000 µg/ml, mostrando os valores das áreas do pico 1.....	68
Quadro 13 - Ensaio de repetibilidade do padrão, na concentração de 250 µg/ml, mostrando os valores das áreas do pico.....	68
Quadro 14 - Resultado das análises de precisão intermediária do pico 1 do extrato etanólico de <i>A. nitidum</i>	69
Quadro 15 - Resultado das análises de precisão intermediária do padrão 1,8-dihidroxi-antraquinona	70
Quadro 16 – Resultado do ensaio de exatidão do padrão 1,8-dihidroxi-antraquinona	70

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Sumário	xii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Apocynaceae	18
2.1.1 <i>Aspidosperma nitidum</i> Benth	19
2.1.1.1 Constituintes químicos de <i>Aspidosperma</i>	22
2.1.1.1.1 Alcaloides indólicos.....	22
2.2 Princípios de cromatografia em fase líquida de alta eficiência.....	26
2.2.1 Métodos cromatográficos.....	26
2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	27
2.2.2.1 Instrumentação.....	27
2.2.2.1.1 Reservatório do solvente.....	29
2.2.2.1.2 Bombas.....	29
2.2.2.1.3 Monitoramento da pressão.....	29
2.2.2.1.4 Injetores	30
2.2.2.1.5 Colunas e termostatos	30
2.2.2.1.6 Detectores	31
2.2.2.1.7 Sistema de dados	32
2.2.2.1.8 Gradiente de eluição	32
2.2.2.1.9 CLAE fase reversa	33
2.2.3 Análises por CLAE.....	34
2.2.4 CLAE no controle de qualidade de plantas medicinais.....	35
2.3 Validação de método em CLAE.....	37
2.3.1 Métodos de padronização	40
2.3.1.1 Padronização externa	40

2.3.1.2	Padronização interna	41
2.3.1.3	Padronização por adição de padrão	41
2.3.2	Seletividade	42
2.3.3	Linearidade e faixa linear	43
2.3.4	Robustez	43
2.3.5	Precisão	44
2.3.6	Limite de detecção (LD).....	45
2.3.7	Limite de quantificação (LQ)	45
2.3.8	Exatidão	46
3.	OBJETIVOS.....	47
3.1	GERAL.....	47
3.2	ESPECÍFICOS.....	47
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Materiais	48
4.1.1	Equipamentos e acessórios	48
4.1.2	Solventes e reagentes	48
4.1.3	Substância de referência (padrão)	49
4.2	Métodos	49
4.2.1	Material vegetal	49
4.2.2	Tratamento do material vegetal e obtenção da matéria-prima vegetal.....	49
4.2.3	Obtenção do extrato seco.....	50
4.2.4	Avaliação da constituição química (MOREIRA, 1979)	50
4.2.4.1	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	50
4.2.4.2	Pesquisa de alcaloides.....	51
4.2.4.3	Pesquisa de ácidos orgânicos.....	51
4.2.4.4	Pesquisa de fenóis.....	52
4.2.4.5	Pesquisa de esteróis e triterpenos.....	52
4.2.4.6	Pesquisa de cumarinas.....	52
4.2.4.7	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	53
4.2.4.8	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	53
4.2.4.9	Pesquisa de heterosídeos cianogénicos	53
4.2.4.10	Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens	54

4.2.4.11	Pesquisa de taninos	54
4.2.4.12	Pesquisa de ácidos voláteis	54
4.2.4.13	Pesquisa de ácidos fixos	55
4.2.5	Desenvolvimento de método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência	55
4.2.5.1	Preparação do extrato para injeção	55
4.2.5.2	Preparação do padrão para injeção	56
4.2.5.3	Condições cromatográficas	56
4.2.6	Validação de metodologia analítica (ANVISA, RE N°899/2003)...	58
4.2.6.1	Curvas padrão do extrato e padrão	58
4.2.6.2	Linearidade	59
4.2.6.3	Repetibilidade.....	59
4.2.6.4	Precisão intermediária.....	59
4.2.6.5	Exatidão.....	60
4.2.7	Análise estatística	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1	Avaliação da constituição química.....	61
5.2	Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61
5.2.1	Desenvolvimento de método analítico	61
5.2.2	Validação de metodologia analítica	63
5.2.2.1	Curvas de calibração e linearidade	64
5.2.2.1.1	Extrato	64
5.2.2.1.2	Padrão	66
5.2.2.2	Repetibilidade	68
5.2.2.3	Precisão intermediária (reprodutibilidade)	69
5.2.2.4	Exatidão	70
6.	CONCLUSÕES	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO.

O uso das plantas na cura de enfermidades é tão antigo quanto o surgimento da humanidade. Logo as primeiras civilizações perceberam que certas plantas poderiam ser utilizadas para a cura de certas doenças. As informações acumuladas a respeito do uso de plantas medicinais foram inicialmente transmitidas oralmente de geração a geração, e com o surgimento da escrita passou a ser compilada em livros (CUNHA, 2003).

Com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Atualmente, em torno de 25 % dos fármacos disponíveis são derivados de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. A maior parte da biodiversidade mundial está presente nos países da América Latina. O Brasil possui cerca de 20 % de todas as plantas e micro-organismos existentes no planeta (CALIXTO, 2005).

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal existentes no Brasil, encontram-se as plantas do gênero *Aspidosperma*, pertencentes à família Apocynaceae, que são encontradas em regiões neotropicais. *Aspidosperma nitidum* Benth. ex Müll. Arg., popularmente conhecida como carapanaúba é uma árvore alta de terra firme (BORRÁS, 2003). As cascas do caule de *A. nitidum* são utilizadas pela população como febrífugo, anti-inflamatório e para o tratamento de inflamações do útero e ovário e diabetes (RIBEIRO *et al.*, 1999). Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie indicaram presença maciça de alcaloides indólicos (HENRIQUE *et al.*, 2010).

As plantas podem possuir centenas de constituintes, alguns deles presentes em concentrações mínimas. Os constituintes das plantas variam em função de fatores externos como temperatura, umidade, luminosidade, método de coleta, secagem e transporte. Portanto, é necessário determinar vários constituintes químicos para assegurar a confiabilidade da

matéria prima vegetal. Neste contexto, o conceito de fitoequivalência tem sido bastante utilizado, pois sugere que um cromatograma *fingerprint* (impressão digital) ou perfil cromatográfico, seja comparado com padrões que poderão ajudar na identificação de amostras autênticas (LIANG *et al.*, 2004).

A importância científica das pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz pelos resultados obtidos com a realização de seus objetivos imediatos, tanto como pela aplicação destes resultados a outras áreas científicas correlatas. O crescente desenvolvimento de novas técnicas, como a cromatografia, e o constante aperfeiçoamento dos instrumentos de análise tem na química de produtos naturais, ao lado da bioquímica, sua principal força motora (MATTOS, 2009).

Atualmente, inúmeras técnicas analíticas são utilizadas para determinar a impressão digital das plantas medicinais, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*) uma das mais utilizadas devido a sua facilidade de manuseio. CLAE é um dos métodos de análise preferido para a separação e quantificação de analitos orgânicos presentes em amostras aquosas e não aquosas. As análises por CLAE são rápidas e eficientes e suas aplicações são praticamente ilimitadas. Quando utilizada como ferramenta analítica, a cromatografia em fase líquida pode determinar o número de componentes em uma mistura, a quantidade de cada componente e o seu grau de pureza (BIDLINGMEYER, 1992).

A obtenção da composição química da planta pode contribuir positivamente para o controle da qualidade de fitoterápicos, pois somente com estas informações pode-se avaliar tecnicamente desde o início do processo, na elaboração do extrato vegetal, até a obtenção do produto final. Deve ser priorizado o desenvolvimento de análises rápidas, de baixo custo e alta especificidade para a garantia da segurança e eficácia do medicamento (PAIVA, *et al.*, 2002).

Os testes de validação de um método analítico são realizados para garantir que o mesmo é preciso, específico, reprodutível e robusto para uma determinada análise. Os métodos de validação fornecem uma garantia de confiabilidade durante o uso de determinado método e por vezes o procedimento de validação é referido como “o processo que fornece provas documentadas de que o método faz exatamente o que era esperado que fizesse” (SHABIR, 2003).

O presente estudo tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico por CLAE em fase reversa para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.

2.1 Apocynaceae.

Estima-se que a flora mundial possua em torno de 250 mil e 500 mil espécies. No Brasil, este número se aproxima de 120 mil espécies, estando a grande maioria presente na região amazônica, destas apenas 10% foram investigadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI *et al.*, 2002). Um grande número, deste total de espécies, é conhecido por seus usos como plantas medicinais. Na medicina popular, plantas medicinais e fitoterápicos são usados para o tratamento de um amplo espectro de infecções e outras patologias. Atualmente, há um grande número de derivados de plantas, como chás, cosméticos e medicamentos, que estão disponíveis no mercado (BANSOD & RAI, 2008). Estudos etnobotânicos mostram que mais de 70% da população mundial que vive em áreas rurais ainda depende, primariamente, da medicina tradicional e de suas plantas medicinais para o tratamento de suas patologias (JERUTO *et al.*, 2008).

Apocynaceae engloba cerca de 550 gêneros, e possui entre 3700 a 5100 espécies, estando entre as dez maiores famílias de Angiospermas. Essa família possui representantes em todos os continentes, os quais crescem em vários ambientes, desde florestas úmidas até regiões semi-áridas, sendo que a maioria das espécies ocorre em regiões tropicais. No Brasil, Apocynaceae é representada por 41 gêneros e 376 espécies. (ENDRESS & BRUYNS, 2000).

Aspidosperma pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília: Plumerioideae e a Tribo Plumerieae (BARROSO, 1991). Apocynaceae é considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos utilizados na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies desta família e muitas destas espécies

representam protótipos de classes farmacológicas distintas de drogas e que fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica (DI STASI *et al.*, 2002). O gênero *Aspidosperma* Mart. ocorre desde o México até a Argentina e distingue-se pela ocorrência frequente de alcaloides indólicos (JÁCOME *et al.*, 2004).

2.1.1 *Aspidosperma nitidum* Benth.

Aspidosperma Mart. pertence à Apocynaceae e é distribuído em regiões neotropicais. Espécies deste gênero são conhecidas popularmente como peroba na maioria das regiões brasileiras e carapanaúba na região amazônica (HENRIQUE, *et al.*, 2010). *Aspidosperma* possui inúmeras espécies, muitas são usadas na Amazônia por suas diferentes propriedades medicinais e pela qualidade de suas madeiras (WENIGER *et al.*, 2001). *Aspidosperma nitidum* Benth., popularmente conhecida como carapanaúba, jacamim, maparaná, canoa-de-carapanã, árvore-dos-mosquitos (Amazonas, Amapá); pinshi caspi, quillo Bordon (Peru), pode ser encontrada desde as Guianas até o Mato Grosso (BORRÁS, 2003).

A. nitidum é uma árvore alta de caule multissulcado verticalmente, possui porte arbóreo de 15 a 25 m, com tronco canelado, folhas oblongas, flores esbranquiçado-aveludadas, dispostas em corimbo e fruto deiscente (Figura 1). É uma árvore de terra firme, pode ocorrer ocasionalmente nos igapós. Sua madeira é dura, sendo muito apreciada pela indústria (BORRÁS, 2003).



Figura 1 – Caule multissulcado e folhas oblongas de *Aspidosperma nitidum*.
Fonte: SIMPSON, D. C.

A presença maciça de alcaloides pode indicar toxicidade. A madeira recém-cortada causa irritação nos olhos e no nariz, com mal-estar geral. A serragem em contato com a pele produz queimadura local e erupção de vesículas, sintomas gerais de fraqueza muscular e câibras, sudorese, queda da temperatura corporal, boca seca e debilidade. A secagem da madeira e o tratamento com solventes diminuem estas reações alérgicas. Estudos feitos com espécies do mesmo gênero encontradas na região amazônica indicaram a presença de substâncias com atividade citotóxica e antitumoral, além de dois indoalcaloides, responsáveis por atuarem na impotência psicogênica de modo semelhante à ioimbina (BORRÁS, 2003).

Popularmente é usada como febrífugo, anti-inflamatório, adstringente, colerético e colagogo. Diversos trabalhos mostram que *A. nitidum* é utilizada como planta medicinal para

o tratamento de diversas enfermidades, como: inflamações do útero e ovário, em problemas de diabetes, do estômago, contra câncer, como contraceptivo (RIBEIRO *et al.*, 1999), contra febre e reumatismo (WENIGER *et al.*, 2001). O látex de *A. nitidum* é utilizado pelas tribos Makuna e Taiwano (na Colômbia) para o tratamento da hanseníase (Quadro 1) (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Indicações	
BORRÁS, 2003	Estimulante, diurético, adstringente vermífugo, analgésico, febrífugo anti-inflamatório, antimalarial, antimicrobiano, hipoglicêmico, colerético e colagogo, atividade citotóxica e antitumoral.
RIBEIRO <i>et al.</i> , 1999	Inflamações do útero e ovário, diabetes, problemas do estômago, contra câncer, contraceptivo, hanseníase.
WENIGER <i>et al.</i> , 2001	Febre e reumatismo
CARVALHO <i>et al.</i> , 1991; BOURDY <i>et al.</i> , 2004	Alívio dos sintomas da malária, com atividade comprovada por testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
HENRIQUE, <i>et al.</i> , 2010	Atividade citotóxica

Quadro 1 - Diversas utilizações de *Aspidosperma nitidum*.

A malária, doença causada pelo protozoário *Plasmodium*, ainda é uma das doenças infecciosas mais devastadoras no mundo. O número de casos letais de malária no mundo é estimado entre 1,5 a 2,5 milhões por ano, especialmente em países em desenvolvimento. Tendo em vista a disponibilidade limitada das drogas sintéticas nesses países, a medicina tradicional ainda é muito utilizada pela população menos favorecida para o tratamento de diversas doenças, incluindo a malária (DHOOGHE *et al.*, 2008). Na Amazônia, as cascas do caule de *A. nitidum* são usadas por nativos para o alívio dos sintomas da malária (BOURDY *et al.*, 2004), a atividade antimalárica atribuída a essa espécie foi comprovada por testes *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 1991).

2.1.1.1 Constituintes químicos de *Aspidosperma*.

2.1.1.1.1 Alcaloides indólicos.

Alcaloides são metabólitos secundários nitrogenados, biossinteticamente derivados de aminoácidos, encontrados principalmente em plantas. Representam uma das mais difundidas classes de substâncias dotadas de múltiplas e variadas propriedades farmacológicas (STÉVIGNT *et al.*, 2005). Um alcaloide é uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros. As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas protoalcaloides. Substâncias nitrogenadas com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os alcaloides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Esse grupo químico tem apresentado um grande impacto através dos tempos na economia, medicina e em outros setores sociais e políticos. O uso de extratos vegetais contendo alcaloides como medicamentos, venenos e em porções mágicas, pode ser traçado desde os primórdios da civilização. Podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial. O amplo espectro das atividades biológicas reportadas aos alcaloides pode ser relacionado com sua variedade estrutural. Diversos alcalóides são utilizados em terapêutica atualmente, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Atualmente são conhecidos cerca de 2000 alcaloides indólicos. Essa classe de substâncias pode ser dividida em dois grupos: o grupo maior, com os alcaloides conhecidos como indólicos monoterpênicos, e o outro, com os demais alcaloides indólicos. Em razão de importantes atividades biológicas, diversos alcaloides indólicos estavam entre as primeiras substâncias isoladas de plantas. Atualmente possuem grande importância econômica devido às suas atividades farmacológicas. A maioria dos alcaloides indólicos é encontrada em três famílias de Gentianales: Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae. Em Apocynaceae podem ser encontradas todas as classes de alcaloides indólicos monoterpênicos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Aspidosperma apresenta como característica marcante é a presença de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, que conferem um amplo espectro de atividades biológicas reconhecidas às espécies desse gênero, tais como antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana, e antibacteriana, consistentes, em muitos casos, com suas utilizações populares. Dentre estas atividades biológicas, a mais representativa é a citotóxica, que tem sido demonstrada frente a diferentes linhagens de células tumorais. Este é o caso, por exemplo, da elipticina, um dos alcaloides indólicos mais estudados, que chegou a ser utilizada em ensaios clínicos no tratamento do câncer (HENRIQUE, *et al.*, 2010).

Alcaloides indólicos encontrados em grande número nas espécies de *Aspidosperma*, confirmam a grande importância dessa classe de substâncias, no que diz respeito à classificação, e divisão de espécies do gênero em sete grupos: Polineura, Pyricolla, Tomentosa, Macrocarpa, Macroloba, Nobiles e Nitida, de acordo com as semelhanças químicas das estruturas alcaloídicas, fato este, que coloca os alcaloides indólicos como marcadores quimiotaxonômicos das espécies de *Aspidosperma* (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nas diferentes séries taxonômicas de *Aspidosperma*, observa-se que podem ser encontrados predominantemente diferentes esqueletos básicos de alcaloides para determinada

série. Na série Nitida observa-se a predominância dos esqueletos aspidoaspermina, ioimbano e geissoschizol. Na série Polyneura, são encontrados esqueletos do tipo aspidoaspermina e pirifolidina. Na série Pyricolla, os esqueletos pirifolidina, elipticina-olivacina, uleína e aparicina são encontrados predominantemente. Estruturas com o esqueleto aspidoalbina são encontradas na série Nobile (PEREIRA *et al.*, 2007).

Em *Aspidosperma*, há predominantemente a ocorrência de alcaloides indólicos de considerável diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto β -carbólico simples, com sistemas tricíclicos de anéis piridoindólicos. Biologicamente, muitos alcaloides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (PEREIRA *et al.*, 2007).

De *A. nitidum* já são conhecidos pelo menos treze estruturas de alcaloides indólicos, merecendo destaque a aspidoaspermina, quebrachamina, e ioimbina, muito comuns em outros representantes do gênero, que na sua maioria estão presentes nas cascas, folhas e galhos (MARQUES *et al.*, 1996). A aspidoaspermina, um alcaloide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002), e a ioimbina, que atua como bloqueador dos receptores α_2 -adrenérgicos, como serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, e aumento da atividade motora e antidiurética (DEUTSCH *et al.*, 1994). Além da aspidoaspermina, quebrachamina, e ioimbina, outros alcaloides também foram encontrados em *A. nitidum*, como: ácido harmanocarboxílico, corinanteol, braznitidumina e desidrositsirikina (Figura 2). Outras substâncias, além de alcaloides também estão presentes

em *A. nitidum*, por exemplo os esteroides β -sitosterol e estigmasterol e os triterpenos β -amirina e lupeol (Figura 3) (PEREIRA *et al.*, 2007).

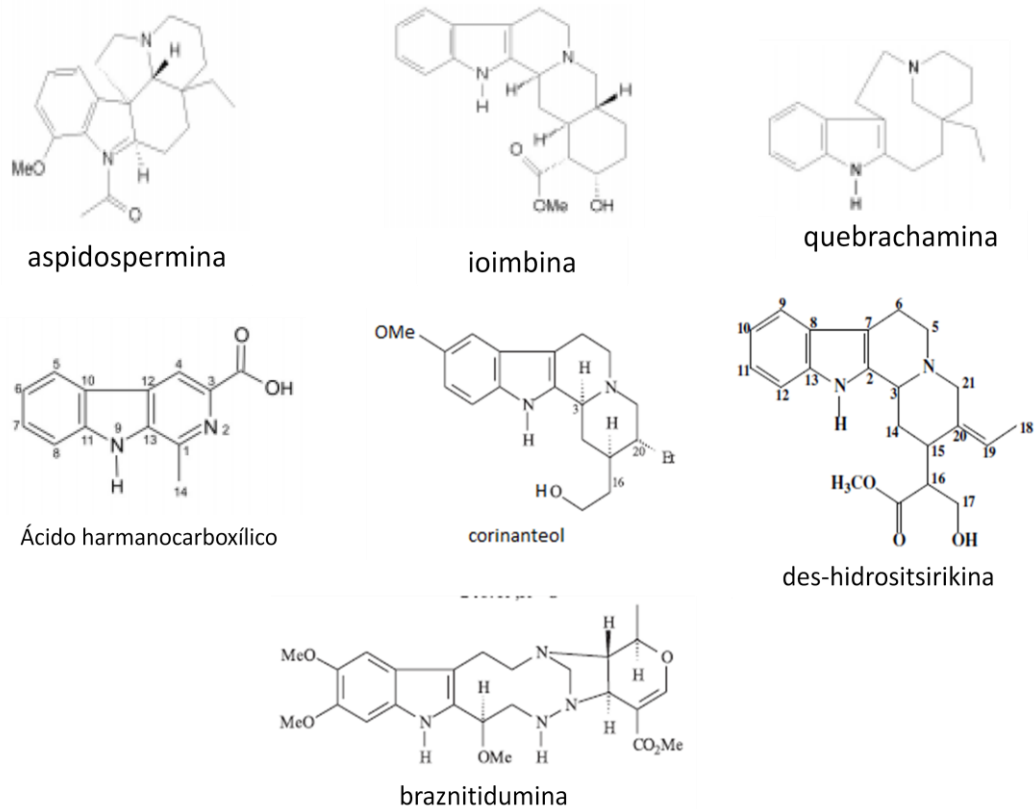


Figura 2 – Alcaloides indólicos encontrados em *Aspidosperma nitidum*.

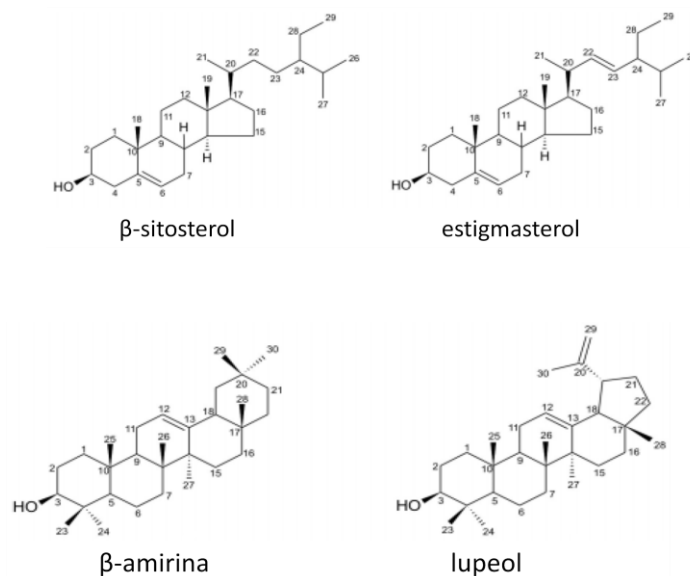


Figura 3 – Esteroides e triterpenos encontrados em *Aspidosperma nitidum*.

2.2. Princípios de cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

2.2.1 Métodos cromatográficos.

Os diferentes processos de separação cromatográfica são aplicados em laboratórios de todo o mundo para decifrar os inúmeros e complexos problemas da química, da bioquímica, das ciências ambientais, da toxicologia etc., tanto no nível acadêmico e em pesquisas como nas aplicações industriais. Os métodos cromatográficos variam desde os de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipulados por não peritos, até os de alta sofisticação, usados apenas por especialistas (COLLINS *et al.*, 2007).

Em sua expressão mais simples, podemos definir a cromatografia como um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico. Sistema cromatográfico é o conjunto formado pela mistura a ser analisada (M), pela fase fixa (FF) e pela fase móvel (FM). A fase fixa, também chamada de fase estacionária, é o meio constituído ou suportado por um sólido poroso, cuja função é reter os solutos. Chama-se esse fenômeno de sorção. A fase móvel é o solvente, neste caso chamado de eluente, que flui através da fase fixa, e tem como função deslocar os solutos. Este fenômeno é denominado dessorção. Neste sistema, a mistura de solutos é levada a migrar através da fase fixa, por meio de um fluxo constante da fase móvel, sendo a diferença de velocidade de migração provocada por processo de competição pelo soluto, entre as duas fases, em função de uma dada propriedade que permita o estabelecimento de equilíbrio de concentração dos componentes da mistura nas duas fases, em grau distinto para cada um deles, pode ser utilizada como propriedade cromatográfica separativa, isto é, em função dela os vários componentes da mistura migrarão com velocidades diferentes através da fase fixa do sistema. A este fenômeno dá-se o nome de migração diferencial (MATTOS, 2009).

2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CLAE é uma técnica de separação que, em poucos anos, se tornou um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. O grande crescimento de sua utilização está relacionado à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, à possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI *et al.*, 2002).

Essa técnica utiliza pressões elevadas que forçam a passagem do solvente através de colunas fechadas contendo partículas microporosas de grande pureza e formato esférico, permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. As análises são mais rápidas e a eficiência é muito mais elevada quando comparada à cromatografia em fase líquida clássica. O formato instrumental permite o uso de detectores, como: ultravioleta, índice de refração, espectrometria de massas, fluorescência, condutividade, eletroquímicos, ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier e evaporativo com espalhamento de luz (BASTOS, 2008).

2.2.2.1 Instrumentação.

Os aparelhos utilizados em CLAE diferem muito do aparato relativamente simples utilizado na cromatografia em fase líquida clássica, pois a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) exige instrumentos mais complexos e sofisticados. Os modernos equipamentos para CLAE são concebidos e fabricados segundo cuidadosas especificações, com o objetivo de obter separações de alta eficiência, assim também como dados quantitativos precisos. Atualmente em CLAE não existe um “melhor” equipamento, pois de

acordo com a necessidade de cada usuário, abordagens diferentes são requeridas para a solução de problemas específicos (SNYDER & KIRKLAND 1979).

De forma sintética, o equipamento funciona da seguinte forma: O solvente, também denominado eluente ou fase móvel, acondicionado em um frasco apropriado, é impulsionado, ou aspirado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. No caminho, a amostra é introduzida na fase móvel, por uma válvula de introdução de amostra (ou válvula de injeção) e arrastada para a coluna, onde ocorre a separação. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluidos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado por um software apropriado, tratado no computador, e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (Figura 4) (LANÇAS, 2009).

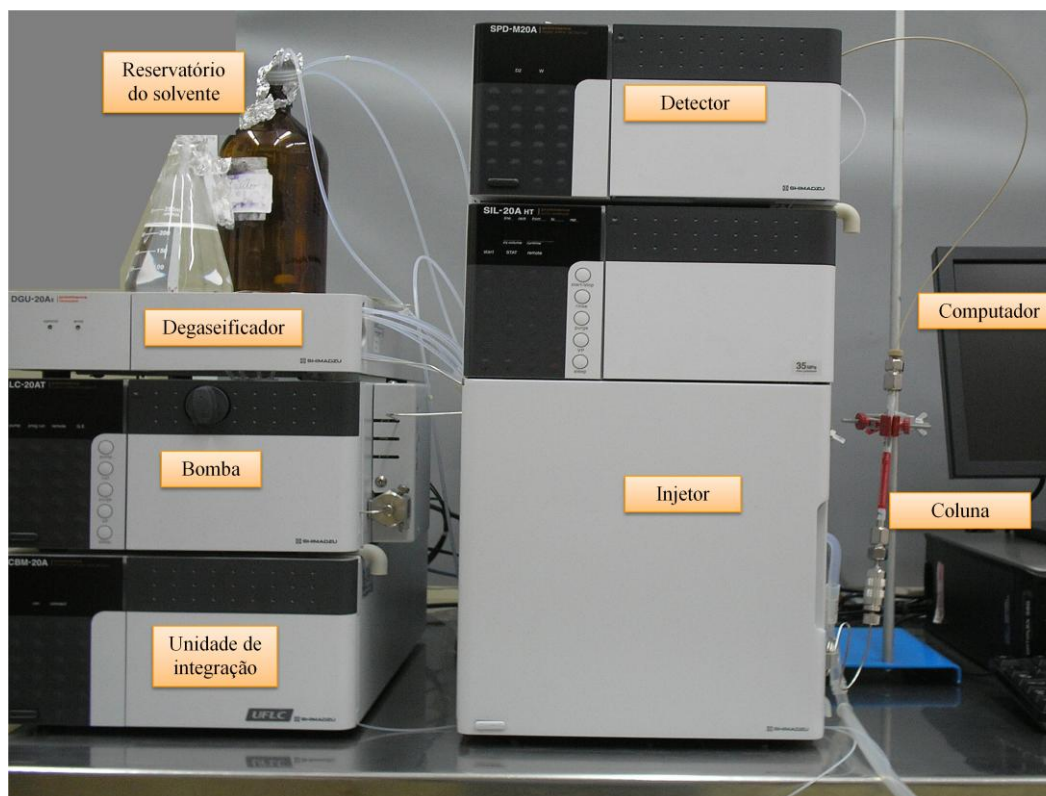


Figura 4 – Componentes de um cromatógrafo a líquido moderno.
Fonte: SIMPSON, D. C.

2.2.2.1.1 Reservatório do solvente.

Atualmente podem-se empregar frascos vazios, de preferência de vidro escuro, podendo utilizar aqueles empregados para armazenar solventes (LANÇAS, 2009). Antes de serem colocados no reservatório os solventes devem ser filtrados, através de material cerâmico ou similar ou em sistema de filtração por membrana (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

2.2.2.1.2 Bombas.

Idealmente as bombas devem ser estáveis, seguras e construídas com materiais compatíveis com os solventes empregados na técnica, geralmente aço inoxidável, apesar de ser vulnerável a ácidos halogenados como o HCl. As bombas de um cromatógrafo a líquido devem pressurizar os solventes com precisão e exatidão, livres de pulsação. Devem ser compatíveis com ampla faixa de fluxo do solvente, fáceis de trocar de solvente, e atender aos gradientes de eluição (LANÇAS, 2009). As bombas são dispositivos robustos, capazes de gerar alta pressão, com um alto nível de exatidão e precisão em qualquer fluxo escolhido (MEYER, 2004).

2.2.2.1.3 Monitoramento da pressão.

Os equipamentos para LC utilizam monitores de pressão, que servem para verificar o desempenho das bombas e da coluna. Eles desligam a bomba quando a pressão ultrapassa o valor estabelecido como seguro (usualmente devido a bloqueio na coluna ou na tubulação por partículas) ou quando atinge valores inferiores a um número estabelecido

(geralmente devido a vazamentos). Assim, coloca-se um monitor de pressão entre a bomba e a coluna para assegurar que a faixa de pressão adequada é obedecida (LANÇAS, 2009).

2.2.2.1.4 Injetores.

A introdução da amostra pode ser realizada manualmente por meio de uma seringa de injeção ou por sistema de injeção automático. O efluente destes dispositivos preenche uma serpentina de volume conhecido e o acionamento da válvula transfere, integralmente, este volume para a corrente da fase móvel (AQUINO-NETO & NUNES, 2003). O propósito de um sistema de introdução da amostra é colocar a mesma na coluna pressurizada na forma de um plugue bastante estreito, com um mínimo de perda de eficiência nesta transferência. Quanto menor o tamanho das partículas na fase estacionária, mais importante e crítico é o sistema de introdução da amostra (LANÇAS, 2009). As válvulas de injeção convencionais, tanto as manuais quanto as automáticas, não são projetadas e nem são rígidas o suficiente para operar em pressões extremas. Para proteger a entrada da coluna das flutuações resultantes do emprego das altas pressões, o processo de injeção deve ser feito em um curto intervalo de tempo e com um fluxo relativamente livre de pulso (MALDANER & JARDIM, 2009).

2.2.2.1.5 Colunas e termostatos.

A separação dos analitos na CLAE é realizada na coluna, considerada o coração do sistema cromatográfico. As colunas para CLAE na grande maioria dos casos são tubos de aço inoxidável 316 tratado, preenchidos por partículas porosas rígidas de diâmetro muito pequeno (1–5 μm), as quais compõem a fase estacionária. A coluna é o lugar onde a fase

móvel está em contato com a fase estacionária, formando uma interface com uma enorme superfície. A maioria dos avanços recentes em CLAE ocorreu no sentido de aprimorar essa interface de contato (KAZAKEVICH & LoBRUTTO, 2007).

2.2.2.1.6 Detectores.

Os componentes da amostra eluídos da coluna precisam ser detectados para que possam ser identificados e quantificados. Os modernos detectores são capazes de operar em uma ampla faixa ou intervalo de concentração, permitindo trabalhos desde a escala analítica até a preparativa. Geralmente apresentam excelente sensibilidade (ex. fluorescência), fornecem informações estruturais importantes sobre os analitos (ex. UV-Vis com comprimento de onda variável e arranjo de fotodiodos, além da espectrometria de massas), e permitem fácil quantificação (LANÇAS, 2009).

Atualmente, é possível combinar duas ou mais técnicas de detecção, para uma melhor identificação de compostos. Muitos autores têm utilizado o detector UV para análise de alcaloides, que pode ter seu alcance de detecção consideravelmente melhorado pelo uso de instrumentos de arranjo de fotodiodos, que são capazes de gerar espectros analíticos completos, bem como os picos convencionais de CLAE (McCALLEY, 2002). O desenvolvimento de um método baseado na combinação da CLAE, com o detector por arranjo de fotodiodos e ionização por “electro spray” juntamente com a espectrometria de massas apresentou bons resultados no que se refere à compreensão, separação sistemática e caracterização de alcaloides em *Sophora flavescens*, onde foi possível identificar 22 alcaloides (LIU *et al.*, 2011). O mesmo método também apresentou bons resultados na análise do perfil cromatográfico e caracterização de cumarinas nas raízes de *Angelica dahurica* pela primeira vez (KANG *et al.*, 2008).

2.2.2.1.7 Sistema de dados.

Utilizando softwares apropriados, os computadores são capazes não apenas de adquirir e tratar os dados provenientes dos detectores, permitindo a análise qualitativa e quantitativa, como também podem ser utilizados para controlar todas as operações do cromatógrafo, desde a formação de gradientes até os detectores, passando pelas válvulas de injeção que podem ser totalmente automatizadas via computador (LANÇAS, 2009).

2.2.2.1.8 Gradiente de eluição.

O meio mais poderoso para influenciar a separação é mudar as propriedades de seletividade do sistema de fases. Isto pode ser feito pelo uso de outro método (v.g. fase normal *versus* fase reversa), o uso de outra fase estacionária (octadecilsilano *versus* sílica fenil-hexil), ou o uso de outra fase móvel, neste último caso, será melhor escolher solventes com grandes diferenças em suas propriedades de seletividade (MEYER, 2004).

Com a versatilidade obtida empregando-se bombas de alta pressão, tornou-se possível a otimização da fase móvel por meio de várias misturas de solventes, executada de diferentes formas. Estas misturas visam conseguir a separação de analitos cuja separação seria muito difícil, ou muito demorada, empregando-se um único solvente. Apesar de se poder empregar uma mistura de solventes como fase móvel, o mais comum é misturar-se os solventes na bomba. Denomina-se eluição isocrática a composição química da fase móvel (seja um solvente puro ou mistura de solventes) que não é alterada durante a eluição. Caso ocorra alteração durante a análise, o processo é denominado gradiente de eluição (LANÇAS, 2009).

Um método para separação de catequinas, ácido gálico e alcaloides presentes no chá de *Camellia sinensis* testou diferentes métodos de eluição: isocrático e gradiente de eluição; e duas fases móveis: uma contendo metanol e ácido orto-fosfórico em água, e outra contendo acetonitrila e ácido orto-fosfórico em água. A otimização da separação dos componentes do chá foi obtida quando uma combinação da eluição gradiente e isocrática foi empregada, mostrando que o método desenvolvido é ideal para uma rápida rotina de análise em curtos períodos de tempo, apresentando boa repetibilidade, é simples, sensível e preciso, podendo ser aplicado para todos os tipos de chás em análises rápidas de rotina (SHARMA *et al.*, 2005).

2.2.2.1.9 CLAE fase reversa.

Cerca de 80-90% de todas as separações analíticas são realizadas em CLAE por fase reversa (KAZAKEVICH & LoBRUTTO, 2007). Anteriormente, a forma mais comum era o uso de fases estacionárias bastante polares e a fase móvel menos polar. Com o desenvolvimento das fases quimicamente ligadas, tornou-se possível substituir o grupo silanol (Si-OH) da superfície da sílica tanto por grupos polares do tipo amino (-NH₂), quanto apolares do tipo octadecilsilano (C-18). Para diferenciar uma forma da outra, convencionou-se que, quando a fase quimicamente ligada é preparada de forma a substituir o grupo silanol por um grupo polar, a coluna estará operando em fase normal. Quando ocorre a substituição do grupo silanol por um grupo não polar, convencionou-se denominar a fase estacionária como fase reversa (LANÇAS, 2009). Os quatro solventes mais utilizados como fase móvel em CLAE fase reversa são água, acetonitrila, metanol e THF (tetraidrofurano) (SADEK, 2002).

Devido a sua natureza estável, a natureza reprodutível das colunas, a composição em grande parte aquosa da fase móvel e a relativa facilidade de reproduzir o método em

diferentes laboratórios, a CLAE em fase reversa é o método de separação de escolha para a maioria dos produtos farmacêuticos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos (MONTGOMERY *et al.*, 2001). É o meio mais popular para análise de substâncias fenólicas (FRANCISCO *et al.*, 2009), e para a análise de conservantes em alimentos (GUARINO *et al.*, 2011).

2.2.3 Análises por CLAE.

A utilização da CLAE nas preparações farmacêuticas de alcaloides teve início há trinta anos, quando a separação de atropina e escopolamina em uma coluna de sílica gel com tetraidrofurano contendo 1% de amônia como solvente foi relatado (DRÄGER, 2002). A partir daí, diversos trabalhos surgiram desenvolvendo ou otimizando metodologias de separação, por exemplo, a separação de seis alcaloides extraídos das folhas de *Strychnos usambarensis*, por meio de uma metodologia para modelar respostas cromatográficas que aperfeiçoou parâmetros de separação por meio de desenho multifatorial. Esta foi a primeira aplicação de uma nova estratégia de otimização para matrizes naturais complexas (NISTOR *et al.*, 2011).

São relatados na literatura diversos trabalhos usando CLAE para a identificação de constituintes potencialmente perigosos, como por exemplo a identificação de alguns alquilfenóis (ácido gincólico e cardanol), presentes no extrato de *Ginkgo biloba*, responsáveis por reações alérgicas da pele, possivelmente mutagênicos e carcinogênicos. A análise por CLAE acoplada à espectrometria de massas possibilitou a identificação de 6 ácidos gincólicos e 2 cardanois no extrato de *Ginkgo biloba* (FUZZATI *et al.*, 2003). Diversos trabalhos mostram a utilização da CLAE na extração e detecção de substâncias em fluídos biológicos,

como por exemplo a determinação de CZ48, um potente candidato a fármaco anticâncer, no plasma de ratos (LIU *et al.*, 2008).

2.2.4 CLAE no controle de qualidade de plantas medicinais.

Plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas para atender as necessidades de saúde ao longo de muitos séculos, e tornou-se cada vez mais popular em todo o mundo durante a última década (JI *et al.*, 2005). Diversas partes das plantas, como galhos, folhas, raízes, flores etc. têm sido continuamente utilizadas para a promoção da saúde ou o tratamento de doenças, sendo normalmente comercializadas como plantas medicinais ou fitoterápicos (ABOU-SHOER *et al.*, 2011). Com uma enorme biodiversidade, possuindo mais de 55.000 espécies catalogadas, a indústria brasileira de fitoterápicos está entre as 10 maiores do mercado mundial, representando 15-20% do mercado farmacêutico local. Apesar disso, a maioria dos fitofármacos comercializados no Brasil é desenvolvida no exterior a partir de plantas não nativas (BELTRAME *et al.*, 2006).

A crença de que plantas medicinais não causam mal à saúde conduz ao uso indiscriminado das mesmas, porém assim como medicamentos sintéticos, as plantas possuem grupos de substâncias farmacologicamente ativas que atuam nos organismos vivos, sendo necessário o conhecimento destas para avaliação de suas potencialidades terapêuticas e tóxicas (LOSQUI *et al.*, 2009). Apesar do uso em grande escala na medicina popular, problemas como identificação e padronização das espécies utilizadas como plantas medicinais são bastante comuns (PAIVA, *et al.*, 2002).

O controle de qualidade das plantas medicinais é de fundamental importância para as autoridades de saúde e principalmente para a população que as utiliza. O perfil cromatográfico das plantas medicinais recebeu atenção crescente nos últimos anos e tem sido

internacionalmente aceito como meio viável para o controle de qualidade de plantas medicinais (LI *et al.*, 2007). O perfil cromatográfico pode ser usado para identificação e autenticação de plantas medicinais, além de avaliar a complexidade e a variabilidade dos componentes químicos de fitoterápicos ou extratos, por isso é recomendado pelas agências de regulamentação (MARTINS *et al.*, 2011)

Plantas medicinais são usadas em todo o mundo para fins preventivos e terapêuticos, portanto, a identificação e controle de qualidade de produtos de origem vegetal é de necessária importância. O perfil cromatográfico é aceito pela Organização Mundial de Saúde como uma técnica de identificação e avaliação da qualidade para plantas medicinais (ALAERTS *et al.*, 2007). No entanto, devido ao fato de que nestas plantas pode haver centenas de componentes ativos complexos, dos quais temos conhecimento limitado, geralmente apenas alguns componentes eficazes são determinados (FENG *et al.*, 2002). Os marcadores químicos desempenham um papel fundamental na avaliação de preparações de plantas, e são rotineiramente utilizados em procedimentos convencionais de identificação, autenticidade e padronização (ABOU-SHOER *et al.*, 2011).

A medicina tradicional chinesa com suas múltiplas ervas, cada uma delas contendo inúmeras substâncias importantes para a atividade medicinal, utiliza a CLAE na análise do perfil cromatográficos de suas espécies medicinais para a determinação da identidade, estabilidade e consistência das mesmas, bem como a identificação de adulterantes. O perfil cromatográfico das espécies vegetais é utilizado no controle de qualidade das matérias-primas vegetal e requisitado pela Administração Chinesa de Drogas e Alimentos como garantia de qualidade para a produção de preparações injetáveis e orais (XIE *et al.*, 2006).

A padronização química de plantas medicinais pode envolver técnicas cromatográficas, como a CLAE, que aliada às técnicas de detecção (por exemplo UV-vis) se

mostra uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas com alta resolução e sensibilidade, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais (PAIVA, *et al.*, 2002).

2.3 Validação de método em CLAE.

Validação é um processo de avaliação que atesta a eficiência em usos de rotina de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido (ARAGÃO *et al.*, 2009). Os procedimentos de validação asseguram a credibilidade dos métodos analíticos, e devem ser realizados para garantir que os mesmos sejam exatos, específicos e reprodutíveis, devendo ser considerada como parte de um conceito integrado para garantir a qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos (SILVA *et al.*, 2006).

O método por CLAE é de grande importância nas análises qualitativas e quantitativas de extratos de plantas, sendo muito útil no controle de qualidade de fitoquímicos. Todavia, a validação de métodos de controle de qualidade precisa ser desenvolvida, visto que a validação dos procedimentos analíticos é uma parte importante do pedido de registro de uma nova droga. Além dos requisitos regulamentares, o desempenho e a confiabilidade do procedimento dos testes de controle são essenciais para o controle de qualidade de drogas (FELIPE *et al.*, 2006).

A validação de métodos cromatográficos envolve os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (ARAGÃO *et al.*, 2009). Além desses parâmetros relacionados ao

método, deve-se testar o equipamento (instrumento e computador), que inclui um protocolo sobre os componentes do cromatógrafo, os quais devem ser testados rotineiramente, em intervalos de tempo predeterminados e, após cada manutenção do equipamento (Quadro 2) (MALDENER, 1989).

	Parâmetro	Valor do erro relativo
<i>Bomba</i>	Exatidão do fluxo	< 5%
	Constância de fluxo, períodos curtos	< 0,5%
	Constância de fluxo, períodos longos	< 0,2%
<i>Injetor</i>	Reprodutibilidade (para > 10µL)	< 0,5%
<i>Detector</i>	Ruído	< 0,04 mAV
	Exatidão do comprimento de onda	< 2nm

Quadro 2 - Requisitos a serem validados em um cromatógrafo líquido.

Segundo sua finalidade, os testes podem ser classificados como: categoria 1 - Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas; categoria 2 - Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas; categoria 3 - Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo); categoria 4 - Testes de identificação. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 3 (ANVISA, 2003).

Parâmetro		Categoria 1	Categoria 2		Categoria 3	Categoria 4
			Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade		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

Quadro 3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. * Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico. ** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar: Métodos não normalizados; Métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório; Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; Ampliações e modificações de métodos normalizados. O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo (INMETRO, 2010).

A validação é um requisito importante exigido para os laboratórios que utilizam um Sistema de Qualidade tipo ISSO 17025 e/ou as Boas Práticas de Laboratórios (BPL). Os procedimentos a serem validados diferem de acordo com os detalhes da análise a ser efetuada. Assim, a análise de resíduos de pesticidas em alimentos requer procedimentos diferentes daqueles empregados, por exemplo, para avaliação de uma impureza em solvente grau

técnico. Da mesma forma, a validação dos métodos necessários para efetuar as duas análises envolverá parâmetros e unidades distintas (LANÇAS, 2009).

Todos os dados relevantes no estudo de validação de um método, como o planejamento, experimentos e resultados obtidos, devem ser documentados e registrados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo. Documentações que registrem etapas da validação são necessárias também para fins de avaliação e podem ser exigidas por razões contratuais ou até mesmo por organismos regulamentadores. Depois de cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante elaborar o procedimento operacional de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambiguidades. A documentação apropriada auxilia na aplicação consistente do método, possibilitando sua execução conforme descrito; caso contrário o desempenho real do método não irá corresponder àquele previsto nos dados de validação. Portanto, a documentação deve minimizar a introdução de variação acidental no método (INMETRO, 2010).

2.3.1 Métodos de padronização

Três diferentes tipos de padronização podem ser utilizados para a construção da curva de calibração. A escolha é feita em função do tipo de análise a ser realizado e do tratamento utilizado para a amostra. O método deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão (CASSIANO *et al.*, 2009).

2.3.1.1 Padronização externa

Quando se utiliza amostras que não precisam de extenso pré-tratamento utiliza-se a padronização externa. Os padrões de calibração são obtidos pela adição de concentrações

conhecidas do analito na matriz. Ao ser aplicado para análises de amostras desconhecidas, esse método compara a área do pico do analito a ser quantificado com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração (CASSIANO *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Padronização interna

A padronização interna consiste na preparação dos padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa do padrão interno. Esse método permite avaliar a variação da resposta em função de manipulações da amostra (por exemplo, concentração, extração, preparo da amostra) (CASSIANO *et al.*, 2009).

Idealmente, o padrão interno deve apresentar similaridade relativa à substância a ser quantificada, seus tempos de retenção devem ser próximos, não deve reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra, sendo este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, já que cada composto produz um espectro característico. O método de padronização interna é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna e tamanho da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

2.3.1.3 Padronização por adição de padrão

Utiliza-se esse método quando não é possível obter a matriz isenta do analito, em matrizes muito complexas, quando há fortes interações entre o analito e a matriz ou quando é

difícil encontrar um padrão interno adequado. Este método consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz, que já contém uma quantidade desconhecida do mesmo. A adição deve ser feita antes do processo de tratamento da amostra. A concentração do analito na matriz biológica é determinada pela extrapolação da reta, definida pelas demais concentrações analisadas (CASSIANO *et al.*, 2009).

2.3.2 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2010). Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ARAGÃO *et al.*, 2009).

Experimentos para avaliação da seletividade envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão comprometidas (INMETRO, 2010).

2.3.3 Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ARAGÃO *et al.*, 2009).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de réplicas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. A linearidade pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2010).

2.3.4 Robustez

Os estudos de robustez consistem na determinação de fatores que possam influenciar o desempenho da metodologia e, conseqüentemente, os resultados (FREITAS, 2008). A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações dos seus valores otimizados. Considera-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Quadro 4). Se estas mudanças estiverem dentro dos limites

de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (ARAGÃO *et al.*, 2009).

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*, que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma das variações. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionado à sua precisão (INMETRO, 2010).

Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel;
	Variação na composição da fase móvel;
	Diferentes lotes o fabricantes de colunas;
	Temperatura;
	Vazão da fase móvel.

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

2.3.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados, embora não necessariamente o correto, obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é considerada em três níveis (Quadro 5): repetibilidade (precisão intracorrída) concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão intercorrída) expressa o efeito das variações dentro do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) mede a precisão do método quando executado em diferentes laboratórios (CASS & DEGANI, 2001).

Analisar: Padrões, materiais de referência ou amostras fortificadas à várias concentrações ao longo da faixa de trabalho	Repetições (independentes)	O que calcular a partir dos dados?	Comentários
a) Mesmo analista, equipamento, laboratório, período curto (repetitividade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração.	Determinar o desvio-padrão amostral da repetitividade de cada concentração.
b) Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração.	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada concentração.
c) Analistas, equipamentos e laboratórios diferentes, período estendido (reprodutibilidade)	≥ 7	Determinar o desvio-padrão amostral (s) de cada concentração.	Determinar o desvio-padrão da reprodutibilidade interlaboratorial de cada concentração. Requer estudo colaborativo.

Quadro 5 - resumo da determinação da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

2.3.6 Limite de detecção (LD).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (NUNES *et al.*, 2005). Pode ser determinado com base na resposta e na inclinação de uma curva de calibração específica, obtida a partir de seis soluções padrão, com valores próximos aos limites de concentração (NEVES *et al.*, 2010).

2.3.7 Limite de quantificação (LQ).

O limite de quantificação (LQ), inferior e superior é a menor e maior, respectivamente, quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais

estabelecidas (NUNES *et al.*, 2005). Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO, 2010).

2.3.8 Exatidão.

A exatidão descreve a proximidade da média dos resultados obtidos em um teste, numa determinada concentração em relação ao valor real, ou seja, é a relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência, sendo, normalmente, determinada por intermédio de, no mínimo, análises em quintuplicatas de três diferentes concentrações, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração, respectivamente (CASS & DEGANI, 2001).

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

- Fármaco, aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;
- Forma Farmacêutica, na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);
- Impurezas, análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco (INMETRO, 2010).

3. OBJETIVOS.

3.1 GERAL:

Desenvolver e validar metodologia analítica, por CLAE em fase reversa para determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar a constituição química qualitativa do extrato etanólico das cascas do caule de *A. nitidum*.

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE em fase reversa para a obtenção do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *A. nitidum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético Nova Ética, modelo 114;
- Balança analítica ANALYSER Mark 210 A;
- Coluna cromatográfica de aço inoxidável Phenomenex[®], Col. Luna 5 µm C18(2) 100 Å , 150 x 4,6mm;
- Coluna cromatográfica de aço inoxidável Phenomenex[®], Luna 5 µm Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm;
- Cromatógrafo analítico Shimadzu[®] modelo LC 20AT *proeminence*, provido de duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A₅, módulo de controle modelo CBM-20A, injetor automático de amostras modelo SIL-20 HT, e detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A; software LCsolutions.
- Liofilizador Vir-Tis, modelo 2KBTES;
- Rotavapor Tech Lab, modelo IKA RV10, com banho de água modelo IKA HB10;
- Sistema de filtração Milipore;

4.1.2 Solventes e reagentes

- Água destilada e água deionizada em equipamento Milli-Q;

- Solventes grau espectroscópico: acetonitrila(ACN) e metanol (MeOH) (Tedia Brasil);
- Ácidos: acético (HAc) e trifluoroacético (TFA).

4.1.3 Substância de referência (padrão)

- 1,8-di-hidroxi-antraquinona, Tradetech[®], lote: FH F01, validade:17/05/17.

4.2 Métodos

4.2.1 Material Vegetal.

O material vegetal (cascas do caule) foi coletado na fazenda experimental da UFAM, localizada na AM-010, no município de Manaus, Amazonas. Uma exsicata foi preparada e depositada no herbário do INPA.

4.2.2 Tratamento do Material Vegetal e Obtenção da Matéria-Prima vegetal.

As cascas do caule foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, as cascas foram submetidas à moagem em moinho de 4 facas.

4.2.3 Obtenção do extrato seco.

A partir do pó das cascas (2 kg), realizou-se a extração com etanol pela técnica de maceração. A solução extrativa etanólica das cascas do caule foi concentrada em rotaevaporador para evaporar e recuperar o máximo possível de solvente presente na solução, logo depois o extrato foi deixado na capela sob jato de ar aquecido, para evaporar o solvente remanescente e, em seguida foi congelado para posterior secagem por liofilização. O extrato foi congelado e seco em liofilizador diretamente, obtendo-se assim o extrato etanólico seco das cascas do caule de *A. nitidum*.

4.2.4 Avaliação da constituição química (MOREIRA , 1979).

O presente ensaio visou analisar qualitativamente a presença dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos da droga vegetal, utilizando, para tanto, reações de coloração e ou precipitação.

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica foi realizado com o extrato hidroalcoólico a 30%, obtido a partir do extrato etanólico seco das cascas do caule de *A. nitidum*.

4.2.4.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 30%

A partir do extrato etanólico seco das cascas do caule de *A. nitidum* foi obtida a solução hidroalcoólica a 30% pela dissolução de 100 mg do extrato seco em 300 mL de álcool etílico a 70% (setenta por cento), a qual foi posta em banho-maria a 70 ° C por 90 minutos. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de

filtro e volume completado com o mesmo solvente até 200 mL. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.2.4.2 Pesquisa de alcaloides.

O ensaio foi realizado utilizando-se os reativos gerais de alcaloides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Berthrand) da seguinte forma: levou-se à secura 50 mL de extrato hidroalcoólico em banho-maria a 70%, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se o extrato clorídrico em 5 tubos de ensaio (1 mL em cada tubo) e adicionou-se em cada um os reativos mantendo o quinto tubo como branco. O aparecimento de precipitado indicou reação positiva. Para contra-prova, 15 mL do extrato hidroalcoólico foram transferidos para um funil de separação e alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 10. Efetuou-se a extração com a mistura éter/clorofórmio (3:1) e submeteu-se o extrato às mesmas reações de alcaloides.

4.2.4.3 Pesquisa de ácidos orgânicos.

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcaloides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

4.2.4.4 Pesquisa de fenóis.

Utilizou-se 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto de ferro III a 1%. O desenvolvimento de coloração confirma a presença de fenóis.

4.2.4.5 Pesquisa de esteróis e triterpenos.

Foram evaporados 20 mL do extrato alcoólico e extraiu-se 3 (três) vezes sucessivas com de 5 mL de diclorometano. Concentrou-se os extratos obtidos a um volume de 3 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul passando a verde demonstra a presença de esteroides e /ou triterpenos.

4.2.4.6 Pesquisa de cumarinas.

Foi transferido para um béquer 30 mL de extrato hidroalcoólico, o qual foi acidificado até pH 1, concentrou-se em banho-maria a 60°C até 10 mL. Foram adicionados ao resíduo 5 mL de água deionizada e extraiu-se em funil de separação com éter etílico em 3 porções de 10 mL.

O volume do extrato orgânico foi reduzido para 5 mL em banho-maria a 60 °C. Colocou-se gotas do extrato etéreo em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado, posto para secar e adicionou-se 1 gota de hidróxido de sódio 1 N em cada

mancha. Uma das manchas foi coberta com uma moeda e observada sob luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.2.4.7 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separadas 3 porções de 5 mL do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e neutralizado com solução de hidróxido de potássio 5% até obter os pHs 5,5 (pH do extrato aquoso), 7,0 (neutro) e 9,5 (básico). A mudança na coloração das porções neutralizadas indica a presença de heterosídeos antociânicos.

4.2.4.8 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Foram agitados 3 tubos obtidos no ensaio de heterosídeos antociânicos energeticamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

4.2.4.9 Pesquisa de heterosídeos cianogénicos

Transferiu-se 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 1 N e então prendeu-se com auxílio de uma rolha uma tira de papel picro-sódico dentro do tubo. O tubo de ensaio foi posto em banho Maria sob temperatura de 60 ° C por 30 minutos. A formação de cor vermelha no papel indica a presença de heterosídeos cianogénicos.

4.2.4.10 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

Em 2 porções de 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado é indicativa da presença de gomas, taninos e mucilagens.

4.2.4.11 Pesquisa de taninos

Adicionou-se a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto de ferro (III) 1%. Na formação de precipitado escuro, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL e nele foi acrescentado 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. A mistura foi levada a refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, filtrou-se a solução e o material retido foi lavado com água destilada e álcool. Se no material retido no filtro houvesse a formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indicaria a formação de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto de ferro (III) 1%, houvesse formação de precipitado escuro ou azul, indicaria a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.4.12 Pesquisa de ácidos voláteis

Foi Acidificado 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N e fervido em um tubo de ensaio em banho-maria. Com papel indicativo de pH foi medida a acidez dos vapores. A coloração ácida indica a presença de ácidos voláteis.

4.2.4.13 Pesquisa de ácidos fixos

Transferiu-se 20 mL de extrato para um balão de destilação juntamente com 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1N. Levou-se o conteúdo ao refluxo por 30 minutos, resfriado e acidulado com ácido sulfúrico 1N e extraiu-se 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, filtrados e depois secos. O resíduo foi aquecido durante 10 minutos a 100°C e após, adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1 N, filtrou-se novamente e transferiu-se para um papel de filtro 3 gotas de modo a obter uma mancha de 1 cm de diâmetro. Secou-se o papel em estufa a 100 °C por 10 minutos e então tratado com o Reagente de Nessler. O desenvolvimento de coloração indica a presença de ácidos fixos.

4.2.5 Desenvolvimento de método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.5.1 Preparação do extrato para injeção

Para ser injetado, o extrato seco foi pesado, diluído em água, metanol ou acetonitrila e filtrados com sistema Milipore[®] para *vials* de 2 mL. Amostras do extrato nas seguintes concentrações foram analisadas: 5 mg/mL, 4 mg/mL, 3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 100 µg/mL, 62,5 µg/mL, 50 µg/mL, 31,25 µg/mL, 25 µg/mL, 20 µg/mL e 12,5 µg/mL.

4.2.5.2 Preparação do padrão para injeção

Para a preparação do padrão de antraquinona, pesou-se 4 mg e dissolveu-se em 4 mg de acetonitrila, que foi filtrado com sistema milipore para *vials* de 2 mL, obtendo-se uma solução mãe na concentração de 1 mg/mL. Realizou-se sucessivas diluições, obtendo-se as seguintes concentrações: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL.

4.2.5.3 Condições cromatográficas

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, utilizou-se o sistema de fase reversa, utilizando uma coluna Phenomenex C18 e uma Phenomenex Fenil-hexil (ambas de 150 x 4,6mm). Os métodos gradiente e isocrático foram testados com diferentes combinações de fases móveis: água:acetonitrila; água:metanol; água/ácido acético 1%:acetonitrila; água/ácido acético 1%:metanol; água/ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% e 0,1%:acetonitrila; água/ácido trifluoroacético 0,5% e 0,1%:metanol.

Testaram-se diferentes vazões de fases móveis: 0,8 mL/min, 1,0 mL/min e 1,2 mL/min. Distintos volumes de injeção foram utilizados: 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL, 10 µL, 12 µL, 14 µL. Foi realizada uma varredura em diferentes comprimentos de onda pelo detector por arranjo de fotodiodos . Os sistemas cromatográficos utilizados são mostrados no Quadro 6.

Sistema 1 - Gradiente		
(A) <ul style="list-style-type: none">• Água;• Água/ácido acético 1%;• Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) <ul style="list-style-type: none">• Metanol;• Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 80:20; 30 min, 20:80;
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Quadro 6 – Diferentes métodos de eluição utilizados.		

Sistema 2 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 25:75; 20 min, 0:100; 30 min, 25:75.
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 3 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 95:05; 30 min, 00:100; 40 min, 95:05.
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 4 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 60:40; 30 min, 25:75; 35 min, 0:100;
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 5 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 95:05; 10 min, 50:50; 20 min, 25:75; 30 min, 0:100;
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 6 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 60:40; 15 min, 50:50; 25 min, 50:50; 40 min, 40:60; 50 min, 40:60; 55 min, 60:40.
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 7 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 95:05; 13 min, 50:50; 27 min, 25:75; 35 min, 0:100; 45 min, 95:05.
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 8 - Gradiente		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min, 95:05; 13 min, 70:30; 40 min, 40:60; 45 min, 0:100.
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		

Continuação quadro 6 – Diferentes métodos de eluição utilizados.

Sistema 9 - Isocrático		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min – 50 min, 50:50
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 10 - Isocrático		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min – 50 min, 60:40
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 11 - Isocrático		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min – 50 min, 40:60
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		
Sistema 12 - Isocrático		
(A) • Água; • Água/ácido acético 1%; • Água/TFA 0,5 e 0,1%.	(B) • Metanol; • Acetonitrila.	(A:B) 00 min – 30 min, 37:63
Vazão de 0,8; 1 e 1,2 mL/min.		

Continuação quadro 6 – Diferentes métodos de eluição utilizados.

4.2.6 Validação de metodologia analítica (ANVISA, RE N°899/2003).

As análises cromatográficas quantitativas por CLAE foram validadas segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (RE-899 de 29 de maio de 2003) da ANVISA.

4.2.6.1 Curvas padrão do extrato e padrão

Para a obtenção das curvas padrão do extrato obteve-se seis soluções do extrato nas seguintes concentrações: 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. As soluções foram preparadas e injetadas durante três dias. Da mesma forma, seis soluções do padrão nas

seguintes concentrações: 15; 31; 62; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas e injetadas em três dias diferentes. Os valores da área dos picos obtidos em cada injeção foram submetidos à análise por regressão linear e os resultados expressos pelo coeficiente de correlação, limite de confiança no ponto de intersecção e pelo coeficiente de inclinação da reta.

4.2.6.2 Linearidade.

A linearidade foi determinada através da análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas de calibração, determinadas pela análise de seis concentrações diferentes do extrato e do padrão. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de regressão linear, limites de confiança no ponto de intersecção e pelo coeficiente de inclinação da reta.

4.2.6.3 Repetibilidade.

A repetibilidade do método foi verificada pelo grau de variação de 6 determinações de uma mesma concentração do extrato e do padrão, realizadas no mesmo dia, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. Os resultados são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação.

4.2.6.4 Precisão intermediária.

Foi verificada através de três concentrações: baixa, média e alta; escolhidas a partir da curva de calibração do extrato e do padrão. As análises foram realizadas em triplicata

de cada concentração em três dias diferentes. Os resultados são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação.

4.2.6.5 Exatidão.

A exatidão foi realizada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da solução padrão adicionada à amostra. O ensaio foi realizado obedecendo a faixa de linearidade do método, pela média do resultado de 6 determinações. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.2.7 Análise estatística (MONTGOMERY, 1991).

A análise estatística constará de análise de variância (ANOVA), regressão e correlação linear e coeficiente de variação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

5.1 Avaliação da constituição química.

A análise da avaliação fitoquímica do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum* mostrou, como esperado, a presença de alcaloides (Quadro 7).

ALCALOIDES	(+) = Formação de precipitado nos 4 reagentes. (+++)
Contra-prova	(-) = Não houve formação de precipitado nos 4 reagentes.
Ácidos orgânicos	(+) = medição por fita = pH 6.
Fenóis	(-) = não houve aparecimento de coloração
Esteróis e triterpenos	(-) = não houve mudança de coloração.
Cumarinas	(-) = não houve fluorescência.
Heterosídeos saponínicos	(-) = não houve formação de espuma.
Heterosídeos antociânicos	(-) = não houve mudança na coloração das porções neutralizadas.
Gomas, taninos e mucilagens	(+) = formação forte de precipitado, (+++)
Ácidos voláteis	(-) = não houve mudança de coloração.
Ácidos fixos	(-) = não houve aparecimento de coloração.
Taninos	(-) = não houve formação de precipitado escuro.
Heterosídeos cianogenéticos	(-) = não houve aparecimento de coloração vermelha no papel picro-sódico.

Quadro 7 - Constituição química do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*.

5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.2.1 Desenvolvimento de método analítico

Diferentes colunas e vários sistemas de solventes, listados no Quadro 6, foram testados com o objetivo de se obter e otimizar um cromatograma com boa separação dos picos do extrato bruto etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*.

O perfil cromatográfico (Figura 5) que apresentou a melhor condição de separação, com melhor resolução dos picos foi obtido utilizando coluna C-18, pelo método

gradiente de separação, com água e acetonitrila como solventes, fluxo de 0,8 mL/min e injeção de 4 µL da amostra do extrato. O comprimento de onda de 275 nm se mostrou o mais apropriado para o extrato analisado (Quadro 8).

Tempo (min)	Fase móvel (%)	
	Água (A)	Acetonitrila (B)
0,01	95	5
13	50	50
27	25	75
35	0	100
45	95	5
45,01	stop	

Quadro 8 – Gradiente de eluição validado.

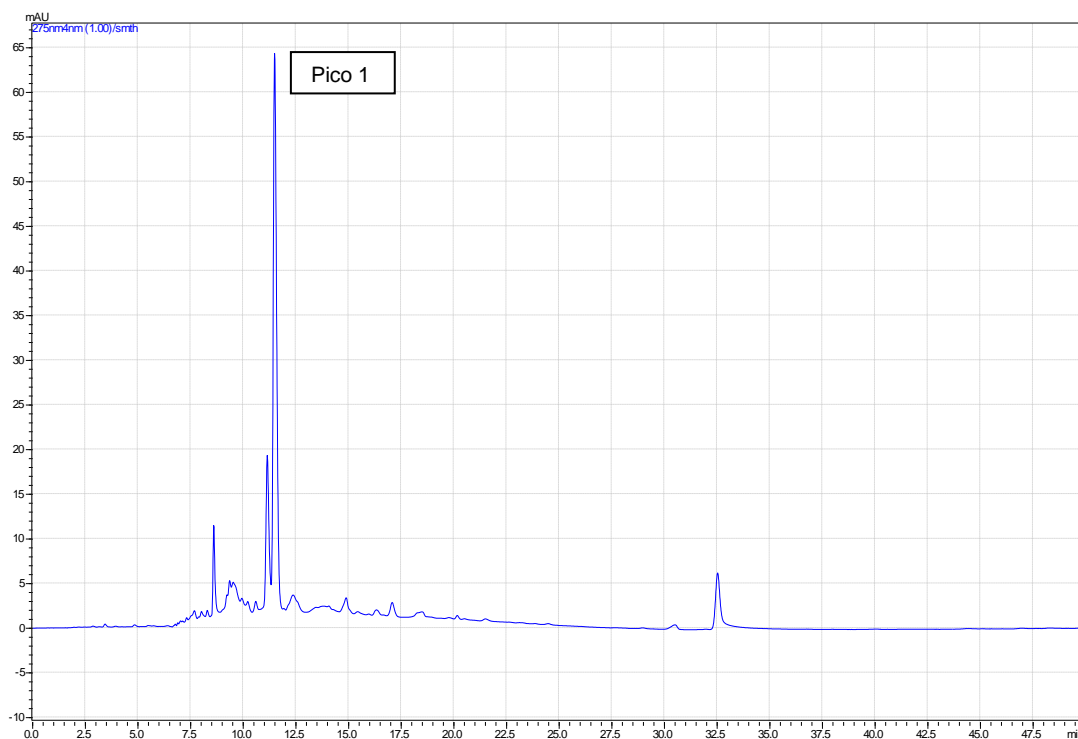


Figura 5 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*, na concentração de 1mg/mL. 4 µL do extrato foi injetado no cromatógrafo a líquido, equipado com uma coluna C-18, utilizando água e acetonitrila como fases móveis, com vazão de 0,8 mL/min.

5.2.2 Validação de metodologia analítica

Devido à impossibilidade de isolamento e identificação dos metabólitos relativos aos picos presentes no cromatograma obtido do extrato etanólico das cascas de *Aspidosperma nitidum*, a validação analítica foi realizada por meio da utilização de um padrão interno. A substância de referência utilizada foi a 1,8-di-hidroxi-antraquinona. A mesma não apresentou interferência nos picos do extrato por apresentar tempo de retenção maior, como pode ser visto nos cromatogramas: isolada (Figura 6) e adicionada ao extrato (Figura 7), obtidos nas mesmas condições do método validado.

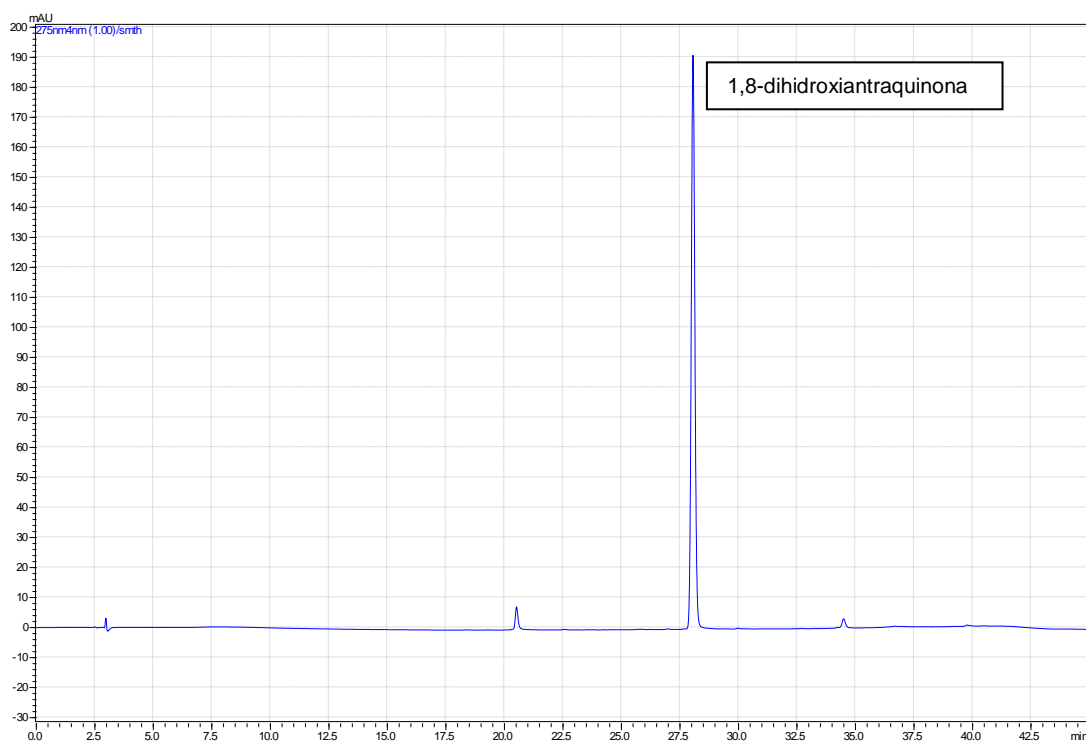


Figura 6 – Perfil cromatográfico da 1,8-di-hidroxi-antraquinona, utilizada como padrão.

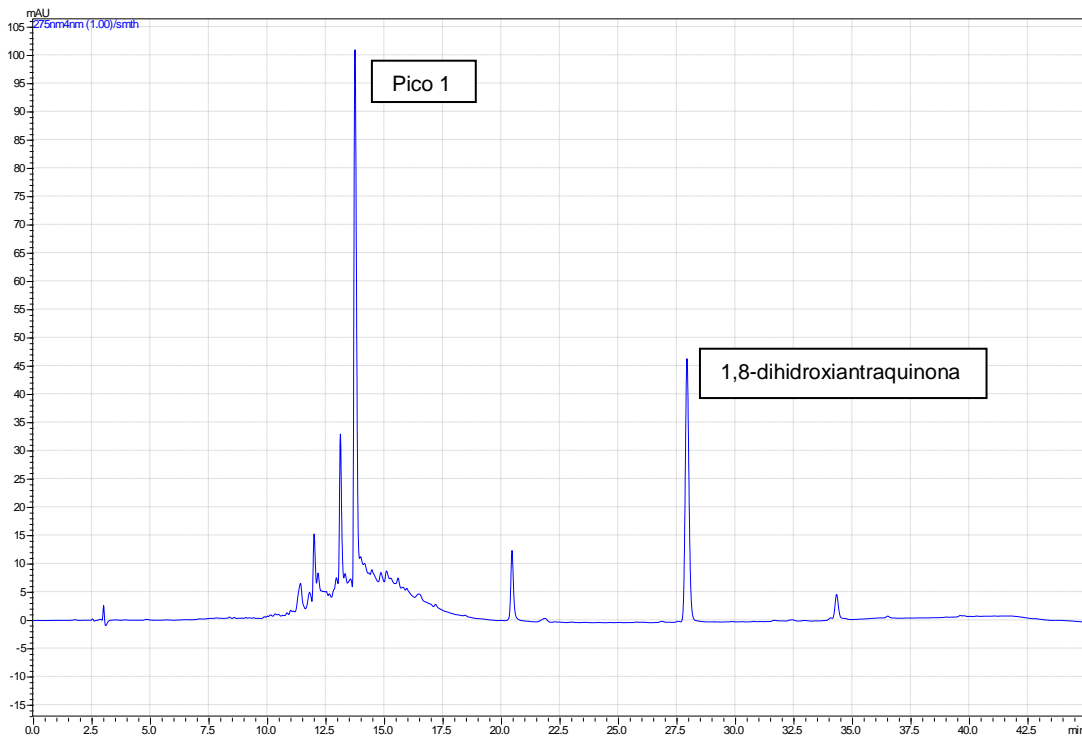


Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Aspidosperma nitidum*, contaminado com a 1,8-di-hidroxiantraquinona, utilizada como padrão.

5.2.2.1 Curvas de calibração e linearidade

5.2.2.1.1 Extrato

As curvas de calibração do extrato etanólico de *A. nitidum* foram obtidas com 6 pontos, obtidos das soluções diluídas do extrato de concentração entre 62,5 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, realizadas em três dias diferentes. A linearidade do pico 1 do extrato foi determinada pela média das três curvas de calibração. Os valores das áreas do pico obtidos nos três dias e as médias são mostrados no Quadro 9 e o gráfico da curva padrão da média dos resultados é mostrado na Figura 8.

Concentrações do extrato em µg/mL	Áreas do pico (mV.s)			Média
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
62,5	21338	25756	22478	23190,7
125	65361	96700	92299	84786,7
250	180193	190843	184675	185237,0
500	405441	388353	394051	395948,3
1000	851884	811568	811214	824888,7
2000	1809287	1799456	1802912	1803885,0

Quadro 9 - Áreas do pico 1 do extrato, em seis concentrações diferentes obtidas em três diferentes dias.

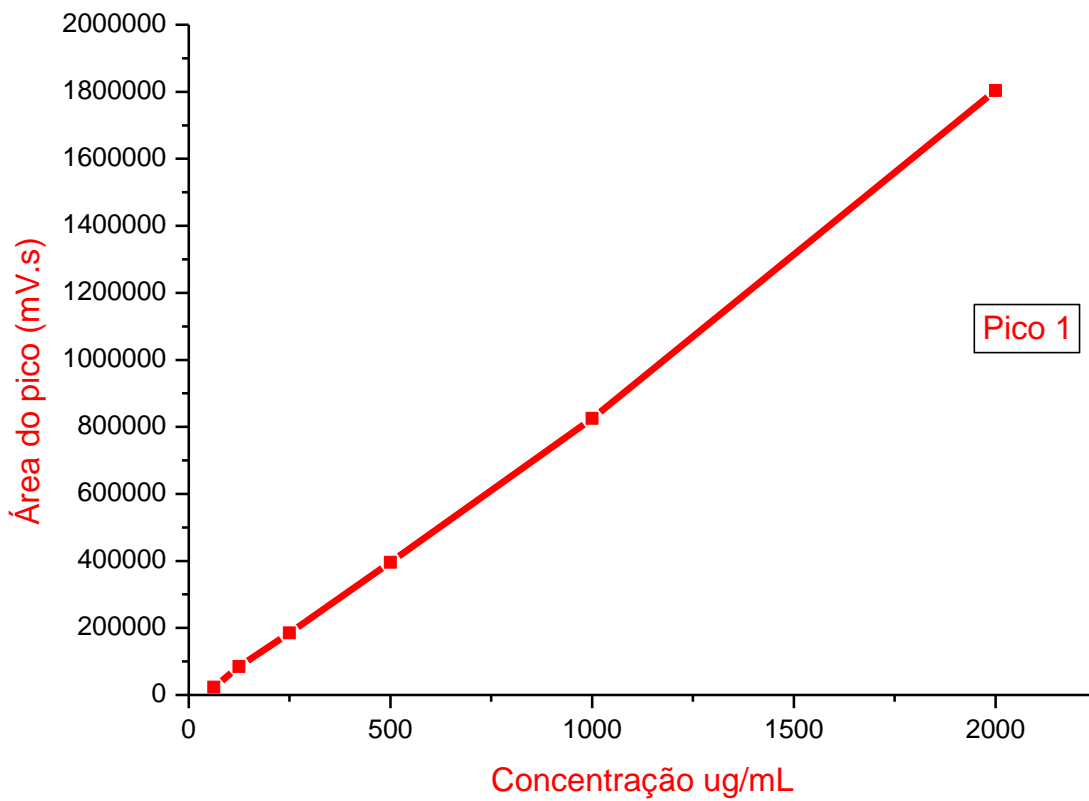


Figura 8 – Curva padrão da área do pico 1 do extrato etanólico de *A. nitidum*.

5.2.2.1.2 Padrão

As curvas de calibração do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona foram obtidas com 6 pontos, obtidos das soluções diluídas do padrão de concentração entre 15 e 500 µg/mL, realizadas em três dias diferentes. A linearidade do padrão foi determinada pela média das três curvas de calibração. Os valores das áreas do pico obtidos nos três dias e as médias são mostrados no Quadro 10 e o gráfico da curva padrão da média dos resultados é mostrado na Figura 9.

Concentrações do extrato em µg/mL	Áreas do pico			Média
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
15	82142	79567	83529	81746,0
31	144795	141478	146943	144405,3
62	226767	221832	227345	225314,7
125	543714	521802	527785	531100,3
250	923073	981541	934660	946424,7
500	2051399	1994887	2030036	2025440,7

Quadro 10 - Áreas do pico do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona, em seis concentrações diferentes obtidas em três diferentes dias.

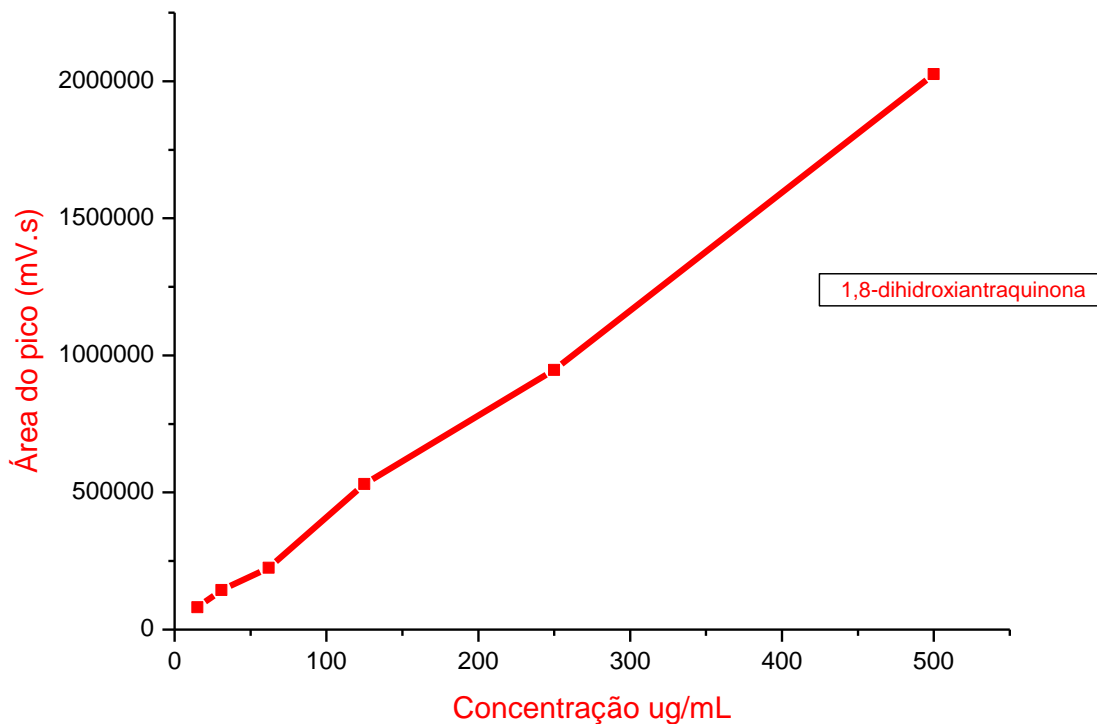


Figura 9 – Curva padrão da área do pico do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona.

Todas as curvas obtidas do pico 1 do extrato etanólico de *A.nitidum* e do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona apresentaram coeficiente de regressão (r^2) > 0,99. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de regressão maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, o que mostra relação linear entre a concentração e a área nos intervalos de concentrações analisados: do extrato (62,5 a 2000 µg/mL) e do padrão (15 a 500 µg/mL). Os coeficientes de variação da inclinação das retas foram inferiores a 2%, indicando alta linearidade (Quadro 11).

Substância	r ²	Equação da reta	Inclinação	Desvio padrão	CV%
Pico 1	0,9987	y=913,9560673x - 46794,28027	913,9561	9,1871	1,0052
1,8-dihidroxiatraquinona	0,9979	y=3994,71986x - 4603,6743	3994,7199	34,2374	0,8571

Quadro 11 - Parâmetros de linearidade para o padrão e o pico 1 presente na solução extrativa do extrato etanólico de *A. nitidum*.

5.2.2.2 Repetibilidade

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi avaliada a partir de injeções em sextuplicata do extrato na concentração de 1000 µg/ml (Quadro 12) e do padrão na concentração de 250 µg/ml (Quadro 13). Os resultados foram expressos pela média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Repetições	Áreas do pico (mV.s)
1	820725
2	830164
3	838474
4	846041
5	848029
6	851884

Média	Desvio padrão	CV %
839219,5	11909,1065	1,4191

Quadro 12 - Ensaio de repetibilidade do extrato, na concentração de 1000 µg/ml, mostrando os valores das áreas do pico 1.

Repetições	Áreas do pico (mV.s)
1	923073
2	923459
3	923879
4	929575
5	930711
6	934660

Média	Desvio padrão	CV %
927559,5	4793,7492	0,5168

Quadro 13 - Ensaio de repetibilidade do padrão, na concentração de 250 µg/ml, mostrando os valores das áreas do pico.

Os resultados de repetibilidade demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre análises realizadas com a mesma amostra, no mesmo dia,

na mesma concentração e com o mesmo equipamento, demonstrando boa reprodutibilidade do método, considerando que os coeficientes de variação obtidos para o extrato e o padrão são menores que 5%.

5.2.2.3 Precisão intermediária (reprodutibilidade)

A precisão intermediária (reprodutibilidade) foi realizada dentro do mesmo laboratório em dias diferentes. Foram realizadas 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, sendo 3 determinações para cada concentração: baixa, média e alta, realizadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos para o extrato (Quadro 14) e o padrão (Quadro 15), foram expressos pela média, desvio padrão e coeficiente de variação.

concentração µg/mL	Área do pico (mV.s)			média	desvio padrão	CV %
	dia 1	dia 2	dia 3			
125 µg/mL	96700	92299	88870	97027,4444	865,2148	0,8917
	98254	96687	98722			
	99065	100109	102541			
Média	98006,3333	96365,0000	96711,0000			
500 µg/mL	388353	394051	383698	406149,0000	10311,7896	2,5389
	398756	408021	408869			
	401245	414754	457594			
Média	396118,0000	405608,6667	416720,3333			
1000 µg/mL	811568	811214	802523	832144,1111	14762,8372	1,7741
	820725	857985	813890			
	848029	877322	846041			
Média	826774,0000	848840,3333	820818,0000			

Quadro 14 - Resultado das análises de precisão intermediária do pico 1 do extrato etanólico de *Aspidosperma nitidum*.

concentração µg/mL	Área do pico (mV.s)			média	desvio padrão	CV %
	dia 1	dia 2	dia 3			
125 µg/mL	530049	521802	527785	530308,5556	5061,0297	0,9544
	531749	525252	529638			
	543714	528155	534633			
Média	535170,6667	525069,6667	530685,3333			
250 µg/mL	923073	981541	929575	945874,5556	31985,07565	3,3815
	923459	981783	930711			
	923879	984190	934660			
Média	923470,3333	982504,6667	931648,6667			
500 µg/mL	2051399	1994887	2015363	2027149,0000	23597,2267	1,1641
	2051677	2007222	2030036			
	2051843	2011572	2030342			
Média	2051639,6667	2004560,3333	2025247,0000			

Quadro 15 - Resultado das análises de precisão intermediária do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona.

O método avaliado apresenta precisão intermediária (boa reprodutibilidade), pois os coeficientes de variação (CV %) encontrados entre as três determinações realizadas para cada concentração em três dias diferentes, estão dentro do limite esperado, isto é, menor ou igual a 5 %.

5.2.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir de injeções em sextuplicata da solução contendo o extrato na concentração de 1000 µg/ml e do padrão na concentração de 125 µg/ml (Quadro 16). Os resultados foram expressos pela média, desvio padrão, coeficiente de variação e porcentagem de recuperação do padrão.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Recuperação (%)	Desvio padrão	CV%
125 µg/mL	132,7 µg/mL	106,2 %	2,341	2,2

Quadro 16 – Resultado do ensaio de exatidão do padrão 1,8-di-hidroxi-antraquinona.

O resultado obtido no ensaio de exatidão mostra uma recuperação média de 106,2%, ficando dentro do limite, que é acima de 90% e abaixo de 110%. O coeficiente de variação obtido, 2,2% está abaixo de 3%. Esses resultados demonstram que o método apresenta boa exatidão.

6. CONCLUSÕES

- A análise da avaliação fitoquímica do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum* sugere qualitativamente a presença de alcaloides, como também sugere a possível presença de ácidos orgânicos, gomas, taninos e mucilagens.
- A CLAE em fase reversa, utilizando coluna C-18, pelo método gradiente, com água e acetonitrila como fases móveis e detector por arranjo de fotodiodos se mostrou boa para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Aspidosperma nitidum*.
- O presente método cromatográfico desenvolvido e validado em sistema de fase reversa, mostrou-se simples, linear, preciso, reprodutível e com boa exatidão, podendo ser utilizado, portanto, para a determinação do perfil cromatográfico do extrato etanólico das cascas do caule *Aspidosperma nitidum*.
- Os resultados obtidos geram como perspectivas para novos trabalhos o isolamento e a identificação do pico majoritário do extrato etanólico das cascas do caule de *Aspidosperma nitidum*, possibilitando realizar o método de padronização externa, utilizando a substância identificada como padrão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABOU-SHOER, M. I.; FATHY, H. M.; OMAR, A. A. **Extract-Template Modeling and Pattern Recognition in the Assessment of (*Cymbopogon Proximus*)**. American Journal of Analytical Chemistry, v. 2, p. 500-510, 2011.

ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; SMEYERS-VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. V. **Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns**. J. Chromatogr. A, v. 1172, p. 1–8, 2007.

ANVISA, Resolução RE 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 29 de maio, 2003.

AQUINO-NETO, F. R. & NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 71-174, 2003.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. **Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas**. Quím. Nova, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

BANSOD, S.; RAI, M. **Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger***. World J. Med. Sci., v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARROSO, G. B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 3, p. 326, 1991.

BASTOS, C. A. **Otimização de metodologia por cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico para análise simultânea de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina em formulações farmacêuticas**. Dissertação de mestrado, Juiz de Fora: UFJF, p. 69, 2008.

BELTRAME, F. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. **A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba**. J. Chromatogr. A, v. 1119, p. 257–263, 2006.

BIDLINGMEYER, B. A. **Practical HPLC methodology and applications**. A Wiley Interscience publication, by John Wiley & Sons, Inc, 1992.

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no mercado municipal Adolpho Lisboa.** Manaus: Editora Valer / Governo do Estado do Amazonas, p. 91, 2003.

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. **A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians.** J. Ethnopharmacol., v.93, p.269-277, 2004.

CALIXTO, J. B. **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view.** J. Ethnopharmacol., v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A. U. **Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studies *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture.** Braz. J. Med. Biol. Res. v. 24, p. 1113, 1991.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação.** Editora da UFSCar: São Carlos, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. **Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas.** Quim. Nova, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental.** Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP: Editora da UNICAMP, p. 17-263, 2007.

CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia.** Fundação Caloste Gulbenkiam, Lisboa, 2003.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. **Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source.** Journal Pharmacology and Biomedical Analysis, v. 12, p. 1283-1287, 1994.

DHOOGHE, L.; MESIA, K.; KOHTALA, E.; TONA, L.; PIETERS, L.; VLIETINK, A. J.; APERS, S. **Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of *Nauclea pobeguini*.** Talanta, v. 76, p. 462-468, 2008.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. - São Paulo: Editora UNESP, p. 605, 2002.

DRÄGER, B. **Analysis of tropane and related alkaloids**. J. Chromatogr. A, n. 978, p. 1–35, 2002.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. **A revised classification of the apocynaceae s.l.** Bot. Rev 66, p. 1-53, 2000.

FELIPE, D. F.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FRANCO, S. L.; CORTEZ, D. A. G. **Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck by HPLC**. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1371–1375, 2006.

FENG, H. T.; LI, S. F. **Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis**. J. Chromatogr. A, v. 973, n. 1-2, p. 243-247, 2002.

FRANCISCO, M. L. dL.; RESURRECCION, A. V. A. **Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts**. Food Chemistry, v. 117, p. 356–363, 2009.

FREITAS, A. A. R. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS**. Dissertação de mestrado, Lisboa: IST, p. 35, 2008.

FUZZATI, N.; PACE, R.; VILLA, F. **A simple HPLC-UV method for the assay of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* extracts**. Fitoterapia, v. 74, p. 247–256, 2003.

GUARINO, C.; FUSELLI, F.; LA MANTIA, A.; LONGO, L. **Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses**. Food Chemistry, v. 127, p. 1294–1299, 2011.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. **Alcaloides indolicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum***. Quim. Nova, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 03, fevereiro, 2010.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. **Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“PAUPEREIRA”)**. Quim. Nova, v. 27, n. 6, p. 897-900, 2004.

JERUTO, P.; LUKHOB, C.; OUMAA, G.; OTIENO, D.; MUTAI, C. **An ethnobotanical study of medicinal plants used by the Nandi people in Kenya**. J. of Ethnopharmacology, v. 116, p. 370–376, 2008.

JI, Y. B.; XU, Q. S. HU, Y. Z. HEYDENA, Y. V. **Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography**. J. Chromatogr. A, v. 1066, p. 97–104, 2005.

KANG, J.; ZHOU, L.; SUN, J.; HAN, J.; GUO, D. A. **Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahurica* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique**. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n. 47, p. 778–785, 2008.

KAZAKEVICH, Y & LoBRUTTO, R. **HPLC For pharmaceutical scientists**. New Jersey, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Ltd., p. 1135, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2009.

LI, Y.; HU, Z.; HE, L. **An approach to develop binary chromatographic fingerprints of the total alkaloids from *Caulophyllum robustum* by high performance liquid chromatography/diode array detector and gás chromatography/mass spectrometry**. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 43, p. 1667–1672, 2007.

LIANG, Y. X.; XIEP, P.; CHAN, K. **Quality control of herbal medicines**. J. Chromatogr. B, v. 812, p. 53-70, 2004.

LIU, G.; DONG, J.; WANG, H.; HASHI, Y.; CHEN, S. **Characterization of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry**. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis v. 54, p. 1065–1072, 2011.

LIU, X.; WANG, Y.; VARDEMAN, D.; CAO, Z.; GIOVANELLA, B. **Development and validation of a reverse-phase HPLC with fluorescence detector method for simultaneous determination of CZ48 and its active metabolite camptothecin in mouse plasma.** J. Chromatogr. B, v. 867, p. 84–89, 2008.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. **Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*.** Rev. Bras. Farmacogn., Braz. J. Pharmacogn., v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

McCALLEY, D. V. **Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques.** J. Chromatogr. A, n. 967, p. 1–19, 2002.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Quim. Nova, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009

MALDENER, G. **Requeriments and test for HPLC apparatus and methods in pharmaceutical quality control.** Chromatographia, v. 28, p. 85-88, 1989.

MARQUES, M.F.S. et al. **Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*.** Phytochemistry, v. 41, n. 3, p. 963-7, 1996.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. **Chromatographic profiles of *Phyllanthus aqueous* extracts samples: a proposition of classification using chemometric models.** Anal Bioanal Chem, v. 400, p. 469–481, 2011.

MATTOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 3º Ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 11-148, 2009.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography.** 4 ° Ed. John Wiley & Sons, Ltd, p. 14-159, 2004.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. **Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids.** Phytomedicine, v. 9, p.142-145, 2002.

MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos.** México: Iberoamérica, 1991.

MONTGOMERY, E. R.; EDMANSON, A. L.; COOK, S. C.; HOVSEPIAN, P. K. **Development and validation of a reverse-phase HPLC method for analysis of efavirenz and its related substances in the drug substance and in a capsule formulation.** J. Pharm. Biomed. Anal. v. 25, p. 267–284, 2001.

MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise em fitoquímica.** Tribuna farmacêutica. v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NEVES, J.; SARMENTO, B.; AMIJI, M. M.; BAHIA, M. F. **Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles.** J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 52, p. 167–172, 2010.

NISTOR, I.; CAO, M.; DEBRUS, B.; LEBRUN, P.; LECOMTE, F.; ROZET, E.; ANGENOT, L.; FREDERICH, M.; OPREAN, R.; HUBERT, Ph. **Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from *Strychnos usambarensis* leaves.** J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n. 56, p. 30– 37, 2011.

NUNES, R. S.; SENNA, B. A. A.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. **Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE.** Rev. Bras. Farm., v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. **Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

PAIVA, S. R.; FONTOURA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; MAZZEI, J. L.; KAPLAN, M. A. C. **Perfil cromatográfico de duas espécies de *Plumbaginaceae*: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM.** Quim. Nova, v. 25, n. 5, p. 717-721, 2002.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. **Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE).** Quim. Nova, v. 30, No. 4, p. 970-983, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; COSTA-MELO, L. F. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quim. Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central, INPA: Manaus, 1999.**

SADEK, P. C. **The HPLC solvent guide**. 2º Ed., New York-NY, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Ltd, p. 334, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. Porto Alegre / Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, 2004.

SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S. D.; KUMAR, V. **A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC**. J. of Food Composition and Analysis, v. 18, p. 583–594, 2005.

SHABIR, G. A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization**. J. Chromatogr. A, v. 987, p. 57–66, 2003.

SILVA, R. M. F.; OLIVEIRA, F. H. C.; STRATMENN, R. R.; PIMENTEL, M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROLIM-NETO, P. J. **Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica para Doseamento da Matéria-Prima e Cápsulas de Sulfato de Indinavir por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Acta Farm. Bonaerense, v. 25, n. 4, p. 578-582, 2006.

SNYDER, L. R. & KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2º Ed., New York-NY, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Ltd, p. 882, 1979.

STÉVIGNY, C. M.; BAILLY, C.; QUERTIN-LECLER, C. Q. **Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids**. Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, v. 5, p. 173-182, 2005.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. **Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados**. Quím. Nova, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. **Antiprotozoal activities of Colombian plants**. J. Ethnopharmacol., v.78, p. 193–200, 2001.

XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; TIAN, R.; UPTON, R. **Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine**. J. Chromatogr. A, v. 1112, p. 171–180, 2006.