

LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO



**ESTUDO QUÍMICO-ANALÍTICO E MORFOANATÔMICO DE
ESPÉCIES MEDICINAIS BRASILEIRAS DA FAMÍLIA
APOCYNACEAE: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) WOODSON
E *Rauvolfia sellowii* MÜLL. ARG.**

CURITIBA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO

**ESTUDO QUÍMICO-ANALÍTICO E MORFOANATÔMICO DE
ESPÉCIES MEDICINAIS BRASILEIRAS DA FAMÍLIA
APOCYNACEAE: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) WOODSON
E *Rauvolfia sellowii* MÜLL. ARG.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré M. Santos

CURITIBA
2010

NOTA BIOGRÁFICA

O autor graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina (2004-2007), onde foi aluno de iniciação científica no Laboratório de Química Farmacêutica e desenvolveu projetos na área de produtos naturais com enfoque em *Mikania laevigata* e sistemas hidropônicos. Em 2008, ingressou no mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, onde desenvolveu esta dissertação.

DEDICATÓRIA

À minha família
e aos que me incentivaram a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela sua orientação, amizade e profissionalismo exemplar. Obrigado pela confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho que tanto contribuiu para minha formação.

À Capes, pela bolsa concedida, de fundamental importância para a realização deste projeto.

À Profa. Nilce Nazareno da Fonte, com carinho. Nossas conversas foram essenciais para a fundamentação de alguns valores e reflexão do que realmente é ser professor e pesquisador.

À Profa. Márcia do Rocio Duarte pelo auxílio no estudo morfoanatômico das espécies deste trabalho.

Ao Prof. Roberto Pontarolo e aos colegas do Laboratório de Bioequivalência da UFPR pelo auxílio na realização da validação do método analítico aqui apresentado. Em especial, a Francinete R. Campos pelo auxílio nos ensaios de validação e espectrometria de massas.

Ao Prof. Norberto Peporine Lopes e sua aluna Denise Brentan da Silva, da USP-RP, pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN de HLA e HLC.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, pela disponibilização do equipamento de RMN para a análise de HLA e HLB.

Ao técnico Nilson Belém Filho, do Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR, pela confecção das lâminas permanentes das espécies aqui estudadas.

Ao biólogo Osmar dos Santos Ribas, do Museu Botânico Municipal de Curitiba, pela identificação de *Rauvolfia sellowii*, e à bióloga Maria Lenise da Silva Guedes, do Herbário Alexandre Leal Costa, da UFBA, pela identificação de *Himatanthus lancifolius*.

À Astrid Wiens, Marianna Erban e Cláudia Seidl, colegas de mestrado, pela sincera amizade, pelo apoio indescritível e pelos momentos de descontração durante esses dois anos. Obrigado por tudo!

Às colegas de mestrado Stella M. Siu Ló e Karina Bora, à Profa. Almeriane Weffort-Santos, à ex-secretária do Programa de Pós-graduação Regina Montrezol e aos alunos de iniciação científica Alessandra Mandarino, Rafaela Miravalhes, Beatriz Lourenço Correa e Rodrigo La Banca Oliveira pelo companheirismo, auxílio e bom humor.

Em especial, à técnica do Laboratório de Farmacognosia, Maria do Rocio Baldon Reis - a "Dona Maria", e à farmacêutica técnica da Central Analítica, Maria da Graça T. Toledo - a "Gracinha", pela amizade, companheirismo e disponibilidade sempre que fosse necessário.

A todos, muito obrigado!

A viagem não acaba nunca.

Só os viajantes acabam.

E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa.

Quando o visitante sentou na areia da praia e disse:

“Não há mais o que ver”, saiba que não era assim.

O fim de uma viagem é apenas o começo de outra.

É preciso ver o que não foi visto,

ver outra vez o que já se viu,

ver na primavera o que se vira no verão,

ver de dia o que se viu de noite,

com o sol onde primeiramente a chuva caía,

ver a seara verde,

o fruto maduro,

a pedra que mudou de lugar,

a sombra que aqui não estava.

É preciso voltar aos passos que foram dados,

para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles.

É preciso recomeçar a viagem.

Sempre.

José Saramago

RESUMO

A família Apocynaceae é caracterizada por espécies que apresentam em sua constituição química, inúmeros compostos terapeuticamente importantes, entre eles glicosídeos cardiotônicos e alcaloides indólicos. Duas espécies dessa família muito utilizadas na medicina tradicional são *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson e *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg., ambas ricas em alcaloides indólicos farmacologicamente ativos e, até o momento, pouco estudadas sob aspectos químicos, farmacológicos e botânicos. *Himatanthus lancifolius*, conhecida popularmente como “agoniada”, tem as cascas do caule utilizadas principalmente para o tratamento de distúrbios menstruais e seus extratos, cujo alcaloide indólico majoritário é a uleína, apresentam atividade em diversos ensaios biológicos. *Rauvolfia sellowii*, por sua vez, é conhecida como “pau-pra-tudo”, é indicada tradicionalmente como anti-hipertensivo e para reduzir os níveis de colesterol e glicose sanguíneos, e contém uma série de alcaloides indólicos importantes, entre eles a reserpina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar estas duas espécies sob aspecto farmacognóstico, procurando estabelecer subsídios químico-analíticos e morfoanatômicos que poderiam ser utilizados para o controle de qualidade dessas plantas medicinais. Para o estudo morfoanatômico, folhas, caules e cascas caulinares de ambas as espécies foram fixados e submetidos às microtécnicas usuais. O estudo fitoquímico de *H. lancifolius* foi realizado com a fração clorofórmica do extrato metanólico das cascas caulinares por meio de técnicas cromatográficas diversas, permitindo o isolamento de três compostos: ajmalina, *epi*-uleína e β -sitosterol. Para *R. sellowii*, foi desenvolvido um método analítico para a quantificação de reserpina nas cascas caulinares, o qual foi posteriormente validado de acordo com a Resolução-RE n. 899/2003 da ANVISA. Os resultados obtidos neste trabalho, quando considerados em conjunto, além de contribuírem com a descrição botânica e química, podem ser oportunamente utilizados para o controle de qualidade dessas drogas vegetais.

Palavras-chave: alcaloides indólicos, Apocynaceae, *Himatanthus lancifolius*, morfoanatomia, *Rauvolfia sellowii*, validação de métodos.

ABSTRACT

The Apocynaceae family is characterized by species that contain several therapeutically important compounds, such as cardiac glycosides and indole alkaloids. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson and *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. are species of this family very used in traditional medicine, both presenting pharmacologically active indole alkaloids and, until the present, had few information about chemical, pharmacological and botanical aspects. The stem barks of *Himatanthus lancifolius*, popularly known as “agoniada”, are used mainly to treat menstrual disorders and the extracts of these barks, which major indole alkaloid is uleine, were active in many biological assays. *Rauvolfia sellowii*, in its turn, is known as “pau-pra-tudo”, it is traditionally indicated as anti-hypertensive and to reduce the cholesterol and glucose blood levels, and it contains many important indole alkaloids, such as reserpine. The aim of this work was to characterize both species under pharmacognostic parameters and to establish chemical-analytical and morpho-anatomical subsidies that could be used to quality control of these medicinal plants. To the morpho-anatomical study, leaves, stems and stem barks of both species were fixed and submitted to standard microtechniques. The phytochemical study of *H. lancifolius* was done with the chloroform fraction from the stem barks methanolic extract through some chromatographic techniques, leading to the isolation of three compounds: ajmaline, *epi*-uleine and β -sitosterol. An analytical method was developed to quantify reserpine in stem barks of *R. sellowii*, which was validated according to the Resolution-RE n. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The results from this work, when analyzed together, besides to contribute to botanical and chemical description, can be opportunely used to the quality control of these plant drugs.

Keywords: indole alkaloids, Apocynaceae, *Himatanthus lancifolius*, morpho-anatomy, *Rauvolfia sellowii*, validation of methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos botânicos de <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	32
Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Himatanthus lancifolius</i> em comparação com o padrão de uleína	56
Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Rauvolfia sellowii</i> , comparando com o padrão de reserpina	61
Figuras 4-10. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson – morfologia externa e vista frontal da lâmina foliar: 4. Aspecto morfológico de ramo florífero; 5. Aspecto das folhas, mostrando faces adaxial e abaxial; 6. Fragmentos de casca caulinar, destacando as faces externa e interna; 7. Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, mostrando as estriações da cutícula; 8. Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando contorno levemente ondulado e espessado das células; 9. Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, mostrando estômatos anisocíticos e contorno ondulado das células epidérmicas; 10. Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, destacando a borda periestomática dos estômatos ..	70
Figuras 11-13. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson – folha, em secção transversal: 11. Mesofilo dorsiventral; 12. Pormenor da epiderme e do colênquima, junto à superfície adaxial da nervura central; 13. Panorama geral da nervura central	71
Figuras 14-19. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson – nervura central, em secção transversal: 14. Região medular; 15. Feixe vascular bicolateral de grande porte na nervura central; 16. Detalhe do feixe vascular bicolateral de pequeno porte na nervura central; 17. Detalhe do feixe vascular bicolateral de grande porte na nervura central; 18. Amiloplastos da bainha amilífera; 19. Laticíferos em secção transversal	72
Figuras 20-24. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson – pecíolo, em secção transversal: 20. Panorama geral do pecíolo; 21. Pormenor da epiderme e do colênquima do pecíolo; 22. Detalhe do feixe vascular bicolateral de grande porte no pecíolo; 23. Pormenor do feixe acessório do tipo anficrival no pecíolo; 24. Amiloplastos no parênquima fundamental do pecíolo	73
Figuras 25-32. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson – caule jovem, em secção transversal: 25. Organização caulinar geral; 26 e 27. Detalhe do sistema de revestimento; 28. Detalhe do córtex, do floema externo e do xilema; 29. Pormenor da região cortical; 30. Pormenor da bainha esclerenquimática; 31. Detalhe do xilema, do floema interno e da medula; 32. Pormenor do xilema	

.....	74
Figura 33. Esquema da casca caulinar de <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	75
Figuras 34-36. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – morfologia externa. 34. Aspecto da árvore no hábito; 35. Ramo vegetativo, mostrando aspecto das folhas; 36. Fragmentos da casca do caule, destacando as faces externa e interna	79
Figuras 37-41. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – folha. 37. Aspecto das folhas, mostrando faces adaxial e abaxial; 38. Detalhe do mesofilo dorsiventral; 39. Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando contorno poligonal das células; 40. Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, mostrando estômatos paracíticos e contorno ondeado das células epidérmicas; 41. Panorama geral do mesofilo dorsiventral	80
Figuras 42-47. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – nervura central, em secção transversal. 42. Nervura central mostrando contorno biconvexo, evidenciando o feixe vascular bicolateral e o parênquima fundamental; 43. Pormenor da epiderme e do colênquima junto à superfície adaxial da nervura central; 44. Detalhe da face adaxial da nervura central; 45. Detalhe da face abaxial da nervura central; 46. Laticíferos distribuídos no parênquima fundamental da nervura central, junto à face adaxial; 47. Drusa de oxalato de cálcio encontrada no parênquima fundamental da nervura central, junto a face abaxial	81
Figuras 48-50. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – nervura central, em secção transversal. 48. Feixe vascular bicolateral da nervura central; 49. Detalhe do feixe vascular bicolateral da nervura central, evidenciando o floema externo em faixa contínua e o floema interno agrupado em cordões junto ao xilema; 50. Amiloplastos e laticíferos encontrados nas proximidades do floema externo, na nervura central	82
Figuras 51-55. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – pecíolo, em secção transversal. 51. Panorama geral do pecíolo; 52. Pormenor da epiderme e do colênquima do pecíolo; 53. Detalhe do feixe vascular bicolateral no pecíolo; 54. Pormenor dos feixes acessórios do tipo anficrival no pecíolo; 55. Amiloplastos e drusas de oxalato de cálcio no parênquima fundamental do pecíolo	83
Figuras 56-59. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – caule jovem, em secção transversal. 56 e 57. Organização geral do caule jovem; 58. Pormenor do sistema de revestimento; 59. Detalhe da região da casca no caule	84
Figuras 60-65. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg. – caule jovem, em secção transversal. 60. Detalhe do caule; 61. Pormenor da bainha esclerenquimática incompleta; 62. Drusa de oxalato de cálcio	

encontrada na região medular; 63. Detalhe do lenho e da medula; 64. Pormenor do xilema; 65. Detalhe da região medular	85
Figura 66. Esquema da casca caulinar de <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	86
Figura 67. Cromatograma do extrato de <i>Rauvolfia sellowii</i> (200,0 µg/ml; volume de injeção= 100 µl), utilizando as condições originais do método descrito por Dhooghe e colaboradores (2008)	126
Figura 68. Cromatograma do padrão de reserpina R (50,0 µg/ml; volume de injeção= 100 µl), apresentando tempo de retenção de 26,67 min	126
Figura 69. Cromatograma do padrão de reserpina R (50,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl), apresentando tempo de retenção de 27,38 min .	127
Figura 70. Cromatograma do extrato de <i>Rauvolfia sellowii</i> (1000,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl), utilizando o método otimizado final	128
Figura 71. Cromatograma do padrão de reserpina (10,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl) a 268 nm de acordo com o método preconizado	132
Figura 72. Perfil espectral de UV e pureza de pico da reserpina	133
Figura 73. Curva de calibração da reserpina	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do espectro de RMN- ¹ H de HLA em comparação com dados da literatura	101
Tabela 2. Dados do espectro de RMN- ¹³ C e experimento DEPT de HLA em comparação com dados da literatura	102
Tabela 3. Dados do espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de HLB, em comparação com dados da <i>epi</i> -uleína e uleína descritos na literatura	116
Tabela 4. Dados do espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 52 MHz) de HLB, em comparação com dados da <i>epi</i> -uleína e uleína descritos na literatura	119
Tabela 5. Dados do espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de HLC, em comparação com dados da literatura	123
Tabela 6. Especificações do método otimizado final para quantificação de reserpina em cascas caulinares de <i>Rauvolfia sellowii</i>	129
Tabela 7. Áreas dos picos da reserpina em diferentes concentrações obtidas pela média de três curvas de calibração por CLAE	134
Tabela 8. Parâmetros de calibração da curva de reserpina	135

Tabela 9. Análise de Variância (ANOVA - apenas uma categoria variável; $\alpha= 0,05$) da curva de calibração da reserpina	135
Tabela 10. Repetibilidade (precisão intradia) do método analítico	137
Tabela 11. Precisão intermediária (precisão interdia) do método analítico ...	137
Tabela 12. Ensaio de recuperação (%) de reserpina adicionada em amostras de <i>Rauvolfia sellowii</i>	138
Tabela 13. Avaliação da robustez do método analítico	140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades farmacológicas e indicações populares de espécies do gênero <i>Himatanthus</i>	31
Quadro 2. Alcaloides indólicos identificados em algumas espécies do gênero <i>Rauvolfia</i>	39
Quadro 3. Atividades farmacológicas de algumas espécies do gênero <i>Rauvolfia</i>	41

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Via biossintética da formação do intermediário 3 α (S)-estrictosidina-aglicona a partir do L-triptofano e do geraniol	24
Esquema 2. Formação dos alcaloides indólicos monterpênicos deidrogeissoschizina, catenamina e ajmalicina a partir do produto de condensação da triptamina com a secologanina, a 3 α (S)-estrictosidina	24
Esquema 3. Representação do padrão estrutural e rearranjos das principais classes de alcaloides indólicos monoterpênicos: tipos <i>Corynanthe</i> , <i>Aspidosperma</i> e <i>Iboga</i>	26
Esquema 4. Processo de extração, fracionamento e isolamento de compostos das cascas caulinares de <i>Himatanthus lancifolius</i>	59
Esquema 5. Formação do fragmento <i>m/z</i> 182 de HLA	98
Esquema 6. Fragmentos <i>m/z</i> 158, 157 e 144, que podem ser originados a partir de HLA	99
Esquema 7. Formação dos fragmentos <i>m/z</i> 209 e 194 de HLB	109

Esquema 8. Formação dos fragmentos m/z 181 e 180 de HLB

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Perfil de fragmentação MS/MS de HLA por <i>eletrospray</i> em modo positivo	98
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HLA	103
Espectro 3. Expansão da região de hidrogênios aromáticos (δ 7,50-6,50 ppm) do espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HLA	104
Espectro 4. Expansão da região de δ 4,50 a 3,50 ppm do espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HLA	104
Espectro 5. Expansão da região de δ 3,05 a 1,80 ppm do espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HLA	105
Espectro 6. Expansão da região de δ 1,60 a 0,85 ppm do espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de HLA	105
Espectro 7. Espectro de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de HLA	106
Espectro 8. Espectro de RMN- ¹³ C em experimento de DEPT (50 MHz, CDCl ₃) de HLA	107
Espectro 9. Perfil de fragmentação MS/MS de HLB por <i>eletrospray</i> em modo positivo	109
Espectro 10. Espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de HLB	113
Espectro 11. Expansão do espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) na região entre δ 6,50 a 9,0 ppm de HLB	114
Espectro 12. Expansão do espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) na região entre δ 3,50 a 5,50 ppm de HLB	115
Espectro 13. Expansão do espectro de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) na região entre δ 0,50 a 3,0 ppm de HLB	115
Espectro 14. Espectro de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de HLB	117
Espectro 15. Expansão do espectro de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) na região entre δ 0 a 60 ppm de HLB	118
Espectro 16. Expansão do espectro de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) na região entre δ 100 a 150 ppm de HLB	118
Espectro 17. Espectro de RMN- ¹ H de HLC, com suas respectivas expansões (300 MHz, CDCl ₃)	121
Espectro 18. Expansão do espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da região alifática (δ 1,10 a 0,6 ppm) de HLC	122
Espectro 19. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de HLC	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila	KOH	hidróxido de potássio
ATP	trifostato de adenosila	MAO	monoaminaoxidase
CHCl₃	clorofórmio	MeOH	metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (cofator enzimático; forma reduzida do NADP ⁺)
DAD	detector de arranjo de fotodiodos	Na₂SO₄	sulfato de sódio anidro
DNA	ácido desoxirribonucléico	NaHCO₃	bicarbonato de sódio
DP	desvio padrão	NH₄OH	hidróxido de amônio
DPPH	difenilpicril-hidrazila	NO	óxido nítrico
DPR%	desvio padrão relativo (= coeficiente de variação)	SNC	Sistema Nervoso Central
FAA	solução de formaldeído-ácido acético-álcool	SQR	substância química de referência
FeCl₃	cloreto férrico	TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
GABA	ácido aminobutírico gama-	UV	ultravioleta
H₂O	água		
H₂SO₄	ácido sulfúrico		
HCl	ácido clorídrico		
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>		
i.p.	intraperitoneal		
IFN-γ	intérferon gama		

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA	2
DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
EPÍGRAFE	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ESQUEMAS	11
LISTA DE ESPECTROS	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. ALCALOIDES	18
1.1.1. Alcaloides como agentes farmacológicos	21
1.1.2. Alcaloides indólicos	22
1.1.2.1. Alcaloides indólicos monoterpênicos	23
1.2. FAMÍLIA APOCYNACEAE	26
1.2.1. Aspectos gerais	26
1.2.2. Aspectos botânicos	28
1.3. GÊNERO <i>Himatanthus</i> WILLD. EX. SCHULT.	29
1.3.1. Composição química	30
1.3.2. Atividades farmacológicas	31
1.3.3. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	32
1.4. GÊNERO <i>Rauvolfia</i> L.	34
1.4.1. Composição química	35
1.4.2. Atividades farmacológicas	37
1.4.3. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	42
1.4.4. Reserpina	45
1.5. CONTROLE DE QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS	46
2. OBJETIVOS	52

2.1. Objetivo geral	52
2.2. Objetivos específicos	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. MATERIAL VEGETAL	53
3.2. ESTUDO MORFOANATÔMICO DAS FOLHAS, CAULES E CASCAS CAULINARES DE <i>H. lancifolius</i> E <i>R. sellowii</i>	53
3.2.1. Preparo do material	53
3.2.2. Preparo de lâminas	54
3.2.3. Testes microquímicos	54
3.3. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DAS CASCAS CAULINARES DE <i>H. lancifolius</i>	55
3.3.1. Preparo do extrato e fracionamento	55
3.3.2. Isolamento	56
3.3.2.1. Isolamento de HLA	57
3.3.2.2. Isolamento de HLB	57
3.3.2.3. Isolamento de HLC	58
3.3.3. Elucidação estrutural de HLA, HLB e HLC	58
3.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESERPINA EM CASCAS CAULINARES DE <i>R. sellowii</i>	60
3.4.1. Preparo do extrato	60
3.4.2. Preparo da solução-amostra e das soluções-padrão	60
3.4.3. Análise cromatográfica	61
3.4.4. Otimização do método analítico	62
3.4.5. Validação do método analítico	62
3.4.5.1. Parâmetros avaliados	62
3.4.5.1.1. Especificidade/Seletividade	62
3.4.5.1.2. Linearidade	63
3.4.5.1.3. Intervalo	63
3.4.5.1.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .	63
3.4.5.1.5. Precisão	64
3.4.5.1.6. Exatidão	64
3.4.5.1.7. Robustez	65
3.4.6. Quantificação de reserpina em cascas caulinares de <i>R. sellowii</i> por CLAE	65

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
4.1. ESTUDO MORFOANATÔMICO DAS FOLHAS, CAULES E CASCAS CAULINARES DE <i>H. lancifolius</i> E <i>R. sellowii</i>	66
4.1.1. Resultados	66
4.1.1.1. <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	66
4.1.1.1.1. Morfologia externa	66
4.1.1.1.2. Anatomia da folha	66
4.1.1.1.3. Anatomia do caule e casca caulinar	68
4.1.1.2. <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	76
4.1.1.2.1. Morfologia externa	76
4.1.1.2.2. Anatomia da folha	76
4.1.1.2.3. Anatomia do caule e casca caulinar	77
4.1.2. Discussão	86
4.1.2.1. Folha	86
4.1.2.2. Caule e casca caulinar	94
4.2. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DAS CASCAS CAULINARES DE <i>H. lancifolius</i>	97
4.2.1. HLA – <i>ajmalina</i>	97
4.2.2. HLB – <i>epi-uleína</i>	108
4.2.3. HLC – β - <i>sitosterol</i>	120
4.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESERPINA EM CASCAS CAULINARES DE <i>R. sellowii</i>	125
4.3.1. Otimização do método analítico	125
4.3.2. Validação do método analítico	132
4.3.2.1. Especificidade/Seletividade	132
4.3.2.2. Linearidade e Intervalo	134
4.3.2.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	136
4.3.2.4. Precisão	136
4.3.2.5. Exatidão	138
4.3.2.6. Robustez	140
4.3.3. Quantificação de reserpina em cascas caulinares de <i>R. sellowii</i> por CLAE	141
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
6. REFERÊNCIAS	144

1. INTRODUÇÃO

Os países latinoamericanos destacam-se pelo uso de espécies medicinais devido à grande biodiversidade e também a uma antiga tradição cultural no uso de plantas, que vem sendo praticada pelos nativos há séculos. No Brasil, particularmente, a intensa mistura de culturas (indígena, africana e europeia) levou a introdução de espécies nativas de outros continentes. Espécies medicinais nativas foram usadas durante décadas pelas companhias farmacêuticas no Brasil para a produção de fitoterápicos, porém a falta de estudos farmacológicos que comprovassem a eficácia e a segurança destas espécies promoveu a substituição delas por espécies estrangeiras na produção destes medicamentos. O atual aceleramento na destruição dos ecossistemas brasileiros contribui para a perda gradual de conhecimento sobre as plantas medicinais usadas tradicionalmente e aponta a necessidade urgente de recuperar dados sobre a flora nativa e promover estudos científicos (Brandão et al., 2009).

Atualmente, a importância das plantas medicinais é amplamente reconhecida e o conhecimento acumulado através dos séculos tem servido de base para pesquisas químicas e farmacológicas. Mesmo nos Estados Unidos, onde até pouco tempo atrás as plantas medicinais eram classificadas, para fins de registro, como “complementos alimentares”, tem havido um crescimento considerável da fitoterapia dentro do sistema de saúde (Kaplan et al., 2007).

A fitoterapia constitui-se em uma opção terapêutica eficaz, acessível e culturalmente apropriada. Em vista disto, um grande número de prefeituras municipais tem estruturado programas de uso e dispensação de fitoterápicos em seus sistemas de saúde, como é o caso dos municípios de Campinas, Curitiba e Vitória. Em vários estados, como Santa Catarina e Paraná, foram criadas associações ou comitês de plantas medicinais, visando envolver os vários setores da sociedade ligados ao tema, desde comunidades de agricultores e movimentos populares de saúde até pesquisadores, indústrias farmacêuticas e organismos gestores de políticas públicas (Reis et al., 2004).

O sucesso da fitoterapia também depende de aspectos como a qualidade das plantas e a garantia de atendimento constante da demanda. É necessário rigoroso controle desde o cultivo, coleta, armazenamento e pré-tratamento do vegetal, bem como dos procedimentos de extração, padronização,

acondicionamento, entre outros (WHO, 1998). Nos últimos anos, políticas nacionais foram criadas na tentativa de padronizar e regulamentar a produção de fitoterápicos no Brasil, a fim de garantir que estes produtos tenham qualidade adequada e que possam ser utilizados pela população que não possui acesso a tratamentos de saúde convencionais, como é o caso da Resolução n. 48, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004), que dispõe sobre o registro de fitoterápicos, e o Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006 (Brasil, 2006), que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Essa Política incentiva o fomento à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população. Também apoia a promoção e o reconhecimento das práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, visando o uso seguro e sustentável de plantas medicinais, a identificação e implantação de mecanismos de validação/reconhecimento que levem em conta os diferentes sistemas de conhecimento (tradicional/popular *versus* técnico-científico) e também a transmissão do conhecimento entre gerações (Brasil, 2006).

Considerando-se a diversidade de espécies vegetais no planeta e a vasta gama de informações etnofarmacológicas sobre o uso de plantas com finalidades terapêuticas, há a necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico das plantas medicinais. Como a maior parte da flora ainda é desconhecida do ponto de vista químico, bem como o conhecimento tradicional associado a ela, principalmente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (Elisabetsky; Souza, 2004).

1.1. ALCALOIDES

Os alcaloides compreendem um grupo de metabólitos secundários incomparável a qualquer outro grupo de produtos naturais, apresentando uma grande diversidade estrutural, vias biossintéticas complexas e atividades farmacológicas terapeuticamente importantes (Cordell, 1981).

De um modo geral, os alcaloides são compostos nitrogenados, possuem caráter alcalino e em sua maioria são farmacologicamente ativos. No entanto, há algumas exceções, como é o caso da colchicina, do ácido aristolóquico e dos

alcaloides quaternários que possuem caráter ácido (Cordell et al., 2001). O caráter básico dos alcaloides depende da disponibilidade do par de elétrons do átomo de nitrogênio. Se um radical adjacente ao nitrogênio é doador de elétrons, como os grupos alquila, a disponibilidade do par de elétrons no nitrogênio é maior e o composto torna-se mais básico. O contrário é observado quando um radical receptor de elétrons está ligado ao nitrogênio, como os grupos carbonila, e conseqüentemente a disponibilidade do par de elétrons é menor e a basicidade diminui (Cordell, 1981).

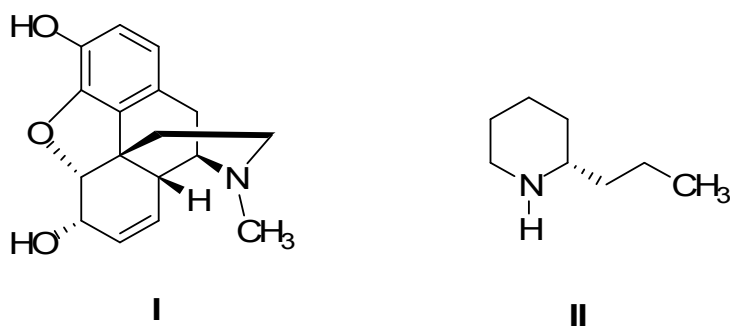
Esse caráter básico característico da maioria dos alcaloides, decorrente da presença de um ou mais átomos de nitrogênio tipicamente na forma de amins primárias, secundárias ou terciárias, facilita o seu isolamento e purificação, uma vez que sais solúveis em água podem ser gerados na presença de ácidos minerais (Dewick, 2002). Fisiologicamente, em valores de pH comumente encontrados no citosol (pH 7,2) e no vacúolo (pH 5 a 6) de células vegetais, o átomo de nitrogênio está protonado, e conseqüentemente, os alcaloides estão carregados positivamente e são solúveis em água (Taiz; Zeiger, 2002).

Os alcaloides podem ser classificados em alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides, de acordo com a sua origem biossintética e com o sistema heterocíclico de anéis. Os alcaloides verdadeiros - cuja classe compreende a maioria dos alcaloides até hoje identificada - são tóxicos, exibem um amplo espectro de atividades fisiológicas, são quase invariavelmente básicos, normalmente contêm um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, são derivados de aminoácidos, possuem distribuição taxonômica limitada e normalmente ocorrem em plantas como um sal de ácido orgânico. Os protoalcaloides também são originados de aminoácidos, porém o átomo de nitrogênio não está localizado em um anel heterocíclico, são básicos, e são conhecidos por amins biológicas, como é o caso da mescalina e da efedrina. Os pseudoalcaloides, por sua vez, não são derivados de um aminoácido precursor, mas geralmente são básicos, e compreendem o grupo dos alcaloides esteroidais (conessina) e dos alcaloides púricos ou metilxantinas (cafeína) (Cordell, 1981; Henriques et al., 2004).

A primeira droga alcaloídica quimicamente investigada foi o ópio, o qual consiste do látex dessecado das cápsulas imaturas da papoula (*Papaver somniferum* L.), sendo utilizado durante séculos em virtude das suas propriedades analgésica e narcótica. Em 1803, Derosne isolou um alcaloide semipuro do ópio e nomeou-o de narcotina. Em 1805, estudos adicionais com o ópio realizados por

Setürner, levaram ao isolamento da morfina (I) e a descoberta de seu caráter básico (Cordell, 1981). A morfina foi o primeiro composto de origem vegetal a ser comercializado, no ano de 1826 (Cordell et al., 2001).

Os primeiros estudos de isolamento de alcaloides por Pelletier e Caventou, na Universidade de Paris no período de 1817 a 1820, foram baseados nos usos medicinais das espécies *Strychnos nux-vomica* L., *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich., *Piper nigrum* L., *Coffea arabica* L., *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotzch, *Colchicum autumnale* L. e *Conium maculatum* L. Destas espécies, foi possível caracterizar alcaloides com grande importância farmacológica, entre eles estricnina, emetina, brucina, piperina, cafeína, quinina, cinchonina, colchicina e coniina (II). Este último, em virtude da sua simplicidade estrutural, foi o primeiro alcaloide a ser sintetizado, em 1886. No início do século XX, dos 119 compostos derivados de noventa plantas que eram usados como agentes medicinais, 54 eram alcaloides (Cordell, 1981; Cordell et al., 2001).



Sob aspecto fisiológico, a importância dos alcaloides para o metabolismo vegetal foi durante muito tempo alvo de controvérsias. Estes compostos já foram considerados simples metabólitos de excreção do metabolismo do nitrogênio, assim como a ureia e o ácido úrico o são em animais, compostos armazenadores de nitrogênio e reguladores de crescimento (Taiz; Zeiger, 2002). Acredita-se que eles possuem função protetora devido à elevada toxicidade, uma vez que geralmente são depositados nos vegetais em tecidos periféricos, provavelmente uma forma de defesa contra herbívoros (Manske; Holmes, 1950). Outra forma de defesa de plantas ricas em alcaloides é o efeito alelopático, onde ocorre uma interação do tipo planta-planta, inibindo o crescimento de vegetais próximos que possam competir por nutrientes e luminosidade. Adicionalmente, muitos alcaloides são considerados pesticidas naturais, exercendo efeitos patológicos em insetos, como retardo do

crescimento, desenvolvimento e reprodução, e até mesmo paralisia e morte (Levinson, 1976).

Uma vez que os alcaloides não são tóxicos para as plantas que os produzem, acredita-se que sua biossíntese esteja relacionada à transformação de precursores altamente tóxicos às células vegetais - como os aminoácidos prolina, histidina e triptofano - em compostos de baixa toxicidade ao metabolismo vegetal, no caso as várias classes de alcaloides. Além do mais, os alcaloides possuem função reguladora no metabolismo vegetal, atuando como substâncias reguladoras do crescimento, como o ácido nicotínico, e podem também atuar como ativadores ou inibidores de enzimas, uma vez que seus anéis heterocíclicos são similares àqueles de coenzimas e grupos prostéticos enzimáticos (Manske; Holmes, 1950).

1.1.1. Alcaloides como agentes farmacológicos

Os alcaloides, juntamente com os terpenos, são os metabólitos secundários com maior potencial farmacológico (Di Stasi, 1996) e vários têm servido, e continuam servindo, como importantes ferramentas na elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos. Os alcaloides são caracterizados por suas ações agonistas e/ou antagonistas de receptores nicotínicos, muscarínicos, α - e β -adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, GABAérgicos, e receptores de glutamato e opiáceos. Há ainda alcaloides que atuam sobre canais de potássio, sódio e cálcio; aqueles com atividade inibidora da acetilcolinesterase ou com atividade inibidora da reabsorção de neurotransmissores; assim como alcaloides que podem ligar-se ao DNA, afetando a síntese de proteínas (Cordell et al., 2001).

Os alcaloides podem ser considerados protótipos promissores de novos fármacos, uma vez que são estruturalmente diversos, apresentando cadeias lineares a planares, sistemas policíclicos, moléculas globulares e diversos padrões de conformação, rigidez e flexibilidade, permitindo uma vasta gama de possibilidades para interações do tipo enzima-substrato. A maioria dos alcaloides possui centros quirais únicos ou múltiplos, é extremamente rara a ocorrência de misturas racêmicas, possuem tipicamente peso molecular moderado (250-600 Daltons), e são passíveis a técnicas de purificação e análise espectral. A basicidade da maioria dos alcaloides permite que eles sejam mais solúveis em água, determinando uma maior biodisponibilidade, através da formação de um sal de alcaloide. A diversidade de

grupos funcionais nas moléculas permite modificações que podem introduzir grupos capazes de modular a atividade farmacológica e de reduzir ou aumentar a lipofilicidade, se necessário (Cordell et al., 2001).

O número de alcaloides caracterizados e utilizados terapeuticamente é bastante extenso. Exemplos corriqueiros de alcaloides utilizados na prática terapêutica são a emetina (amebicida e emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgicos), reserpina e protoveratrina A (anti-hipertensivos), quinina (antimalárico), camptotecina, vimblastina e vincristina (antitumorais), codeína e noscapina (antitussígenos), morfina (hipnoanalgésico), quinidina (depressor cardíaco), cafeína (estimulante do SNC), teobromina e teofilina (diuréticos), colchicina (antigotoso), tubocurarina (miorelaxante), efedrina (adrenérgico), castanospermina (antiviral), galantamina (tratamento do mal de Alzheimer), entre outros (Henriques et al., 2004).

O aspecto mais favorável na busca de alcaloides candidatos a novos fármacos, é que eles são derivados de uma fonte natural e abundante. No entanto, a grande maioria das moléculas conhecidas até o momento foi insuficientemente avaliada do ponto de vista biológico e há uma infinidade de plantas ricas em alcaloides que permanecem sem investigação química (Cordell et al., 2001).

1.1.2. Alcaloides indólicos

Do vasto grupo de alcaloides, os derivados do aminoácido L-triptofano representam uma interessante e importante classe de compostos naturais (Frederich et al., 2008), os quais são caracterizados por um anel indólico, comum a todas as estruturas (Schripsema et al., 2004).

O L-triptofano é o precursor biossintético de todos estes alcaloides, porém, exceto para a maioria dos alcaloides simples, é raro que este aminoácido seja a única fonte de carbonos das estruturas. Geralmente muitos carbonos são fornecidos por outras fontes, com as unidades monoterpênicas, resultando em uma grande diversidade estrutural (Cordell, 1981). De um modo geral, os alcaloides indólicos podem ser subdivididos em simples (harmina, harmol), hemiterpenoides (ergotamina) e monoterpénoides (ajmalina)¹.

Do ponto de vista quimiotaxonômico, a maioria dos alcaloides indólicos é encontrada em famílias da ordem Gentianales - Loganiaceae, Rubiaceae,

¹ Cid A. M. Santos, comunicação pessoal.

Naucleaceae e Apocynaceae, onde são observados principalmente alcaloides indólicos monoterpênicos. A ocorrência de alcaloides indólicos fora da ordem Gentianales é bastante rara e, quando encontrados, são normalmente alcaloides indólicos simples (Schripsema et al., 2004).

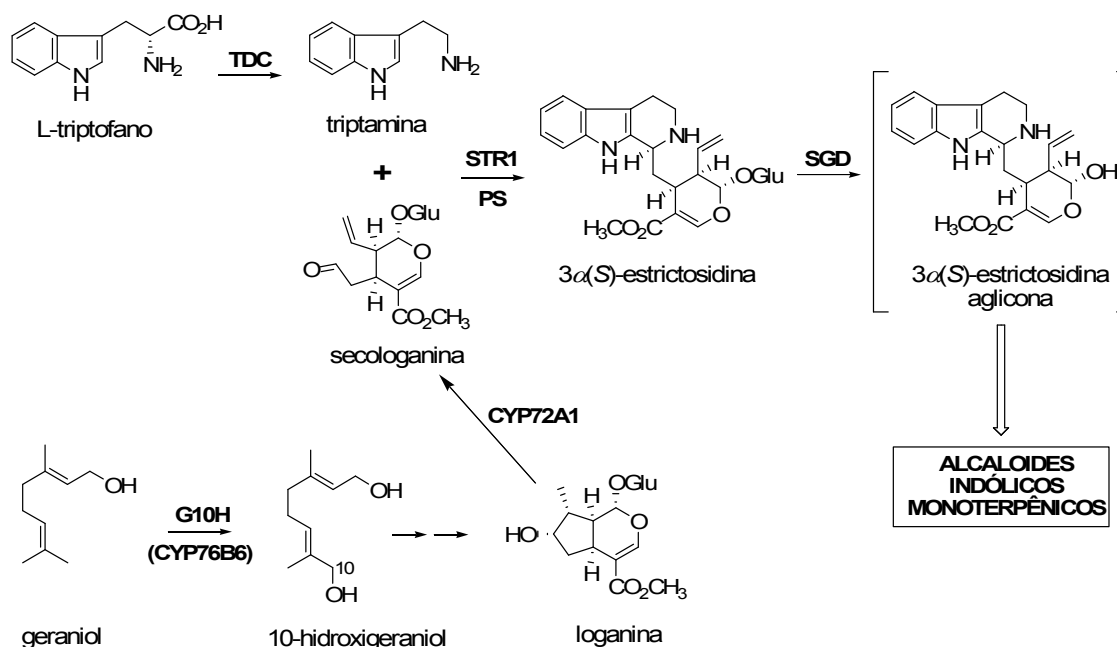
1.1.2.1. Alcaloides indólicos monoterpênicos

Os alcaloides indólicos monoterpênicos compreendem o maior grupo de alcaloides do reino vegetal, com mais de três mil estruturas já identificadas (Dewick, 2002), caracterizadas por uma ampla diversidade estrutural e por muitas atividades farmacológicas (Cordell, 1981). Este grupo de alcaloides, de um modo geral, é derivado da condensação da triptamina com o secoiridoide monoterpênico secologanina (Esquema 1). No entanto, pode haver algumas exceções.

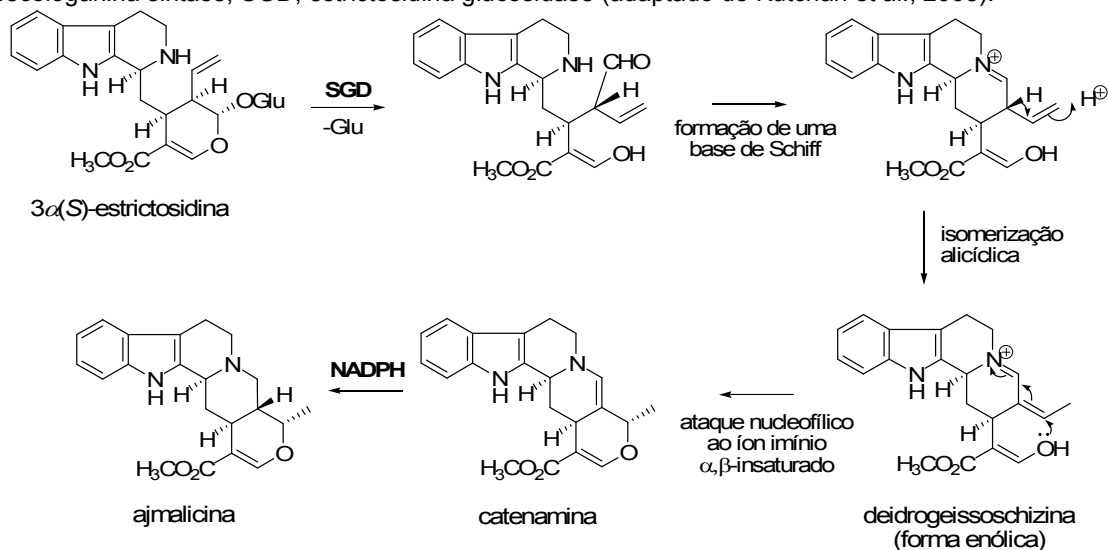
A secologanina é formada a partir do monoterpeneo geraniol, o qual por sua vez é originado do precursor pirofosfato de geranila (GPP) por meio da via do ácido mevalônico. Inicialmente, o geraniol é hidroxilado em C-10 por meio da enzima geraniol-10-hidroxilase (G10H). A enzima G10H é específica para a posição C-10 e exibe afinidade similar tanto para o geraniol quanto para o nerol, seu isômero *cis*. O 10-hidroxigeraniol, através de uma série de reações de oxidação, ciclização, glucosilação e esterificação, forma a loganina. A loganina é convertida a secologanina por meio de reações de oxidação, formação de alceno, clivagem do anel ciclopentânico e hidrólise catalisadas pela enzima CYP72A1. Por sua vez, o L-triptofano é descarboxilado pela enzima triptofano descarboxilase (TDC) formando a triptamina. A triptamina, bem como seus produtos de metilação e hidroxilação, é amplamente distribuída no reino vegetal. A condensação da triptamina com a secologanina, em uma reação de condensação do tipo Pictet-Spengler, é catalisada pela enzima strictosidina sintase (STR1) formando a 3 α (S)-strictosidina, um alcaloide glucosilado com sistema de anéis tetraidro- β -carbolínico. Por sua vez, a eliminação da glucose presente na 3 α (S)-strictosidina, pela strictosidina glucosidase (SGD), forma um produto instável, correspondente a 3 α (S)-strictosidina-aglicona, precursor de todas as classes de alcaloides indólicos monoterpênicos (Facchini, 2001; Schripsema et al., 2004; Kutchan et al., 2008).

A transformação desse produto instável 3 α (S)-strictosidina-aglicona é a chave intermediária na elaboração biossintética de todos os alcaloides indólicos monoterpênicos (Cordell, 1981). Como exemplo, a hidrólise do glicosídeo presente

na 3 α (S)-strictosidina permite a abertura do hemiacetal, e hidrólises adicionais promovem a exposição dos grupos aldeído e álcool com rotação da ligação C-C, os quais podem reagir com a função amina secundária adjacente, produzindo uma base quaternária de Schiff. A isomerização alicídica, movendo uma ligação dupla vinílica, favorece a conjugação com o íon imínio, gerando a deidrogeissoschizina, e posterior ciclização para a catenamina, que por sua vez é reduzida para ajmalicina na presença de NADPH, de acordo com o observado no Esquema 2 (Dewick, 2002).

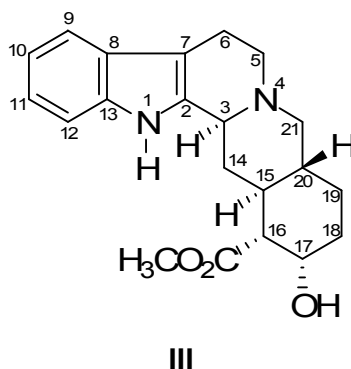


Esquema 1. Via biossintética da formação do intermediário 3 α (S)-strictosidina-aglicona a partir do L-triptofano e do geraniol. TDC, triptofano descarboxilase; STR1, strictosidina sintase; PS, reação de condensação do tipo Pictet-Spengler; G10H (CYP76B6), geraniol 10-hidroxilase; CYP72A1, secologanina sintase; SGD, strictosidina glucosidase (adaptado de Kutchan et al., 2008).

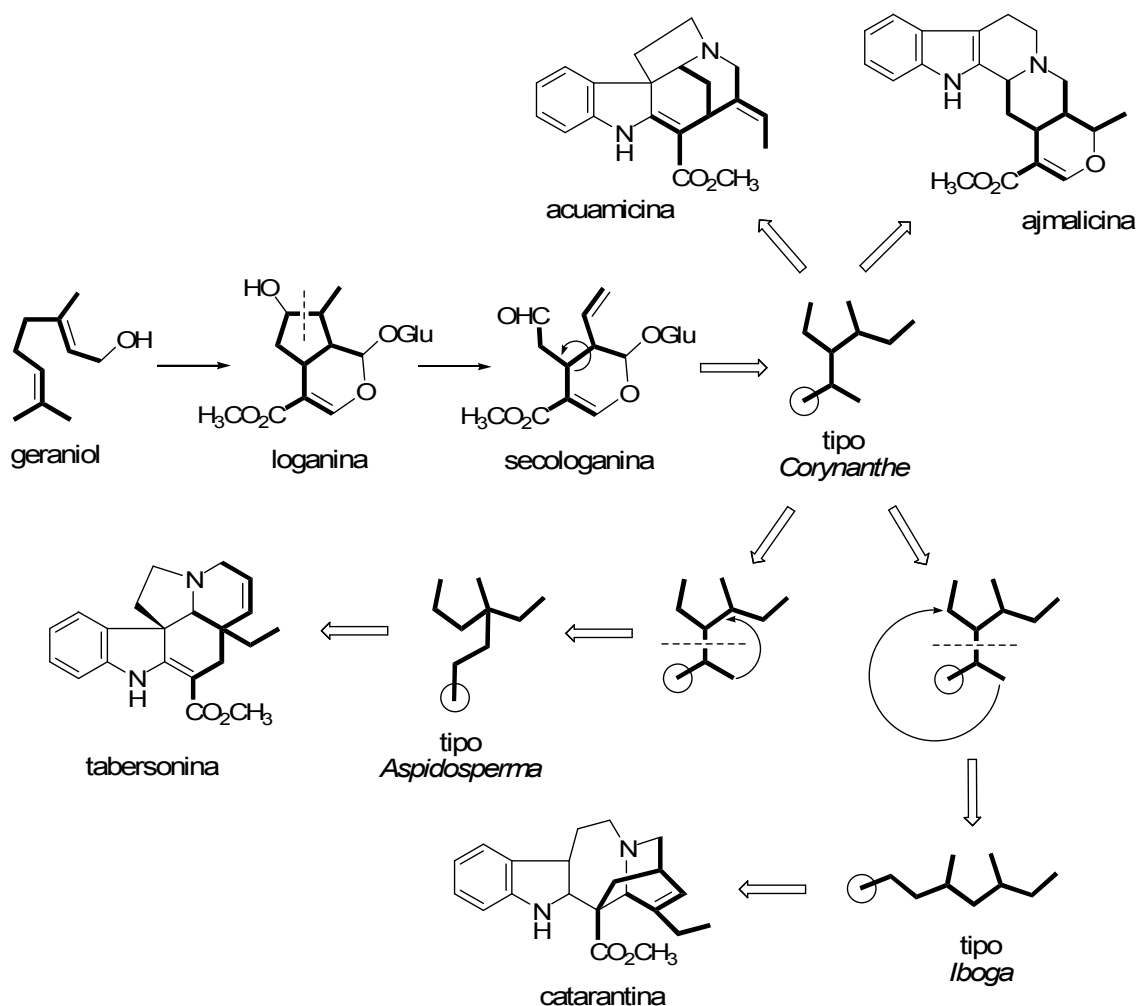


Esquema 2. Formação dos alcaloides indólicos monoterpênicos deidrogeissoschizina, catenamina e ajmalicina a partir do produto de condensação da triptamina com a secologanina, a 3 α (S)-strictosidina. SGD, strictosidina glucosidase (adaptado de Dewick, 2002).

O sistema de numeração atualmente aceito para os alcaloides indólicos monoterpênicos foi proposto por Le Men e Taylor em 1965 e baseia-se no esqueleto da ioimbina (III) (Schripsema et al., 2004).



A classificação atual para os alcaloides indólicos monoterpênicos envolve várias classes, cada uma com características próprias. No entanto, pode-se destacar três principais classes de alcaloides indólicos monoterpênicos: corinanteano ou tipo *Corynanthe* (ajmalicina e acuamicina), aspidospermatano ou tipo *Aspidosperma* (tabersonina) e ibogano ou tipo *Iboga* (catarantina). Acredita-se que estas classes dos tipos *Corynanthe*, *Aspidosperma* e *Iboga* podem estar relacionadas a rearranjos que ocorrem na parte terpenoide das estruturas, derivadas da porção secologanina (Esquema 3). A secologanina contém os dez carbonos do padrão estrutural típico do grupo *Corynanthe*. Os grupos *Aspidosperma* e *Iboga* poderiam surgir do rearranjo do esqueleto *Corynanthe*, uma vez que uma unidade de três carbonos destaca-se, a qual é rejuntada ao fragmento de sete carbonos remanescentes em uma de duas maneiras diferentes (Dewick, 2002).



Esquema 3. Representação do padrão estrutural e rearranjos das principais classes de alcaloides indólicos monoterpênicos: tipos *Corynanthe*, *Aspidosperma* e *Iboga*. O círculo representa a perda da função carboxilato da secologanina por hidrólise/descarboxilação (adaptado de Dewick, 2002).

1.2. FAMÍLIA APOCYNACEAE

1.2.1. Aspectos gerais

A família Apocynaceae, descrita inicialmente por Antoine Laurent de Jussieu (1789), de acordo com o novo sistema de classificação botânica APG II, que leva em consideração características filogenéticas e não apenas morfológicas, é classificada nos seguintes clados, em ordem decrescente: Angiospermas → Eudicotiledôneas → Núcleo Eudicotiledôneas → Asterídeas → Euasterídeas I, na ordem Gentianales (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003). No antigo sistema taxonômico, a família era classificada nos táxons tradicionais: divisão

Magnoliophyta→ classe Magnoliopsida→ subclasse Asteridae→ ordem Gentianales. A família compreende cerca de 400 gêneros com mais de 2000 espécies de distribuição tropical e subtropical em todo o mundo (Tropicos, 2008). São plantas de hábito variado, incluindo ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, latescentes (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. Os gêneros mais importantes dessa família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Wrightia*, *Plumeria*, *Himatanthus* e *Rauvolfia* (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

Várias substâncias têm sido isoladas a partir destes gêneros, sendo que muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas, como por exemplo, os alcaloides de *Rauvolfia* (reserpina, ajmalicina, ajmalina, ajmalinina, serpentina e serpentinina), utilizados em casos de hipertensão e arritmias cardíacas; os glicosídeos cardiotônicos de *Strophantus* (ouabaína, estrofantinidina e cimarina) e os alcaloides antitumorais de *Vinca* e *Catharanthus* (vimblastina e vincristina) (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

Além dos representantes com inúmeras propriedades medicinais, a família Apocynaceae mostra-se uma importante fonte de recursos econômicos. A borracha é obtida do látex de várias espécies, marcadamente com qualidade inferior àquela extraída de *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., a seringueira. Em países africanos e populações indígenas da América do Sul, espécies tóxicas são utilizadas para envenenar flechas na caça de animais e na pesca. Outras espécies fornecem madeiras de excelente qualidade para a confecção de móveis, como é o caso do gênero *Aspidosperma*, cujo representante mais comum é *A. peroba* Allemão ex Saldanha, conhecida como “peroba-rosa” (Metcalf; Chalk, 1950).

Considerando a importância da família Apocynaceae como fonte de compostos com atividade farmacológica, verifica-se a potencialidade dessas espécies e a consequente necessidade de estudos voltados para uma melhor descrição química e biológica, especialmente do grupo dos alcaloides e glicosídeos (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

1.2.2. Aspectos botânicos

Em 1810, Robert Brown propôs a separação das famílias Asclepiadaceae e Apocynaceae pela primeira vez. No entanto, novas evidências de estudos morfológicos mais detalhados e também o desenvolvimento de técnicas moleculares permitiriam a revisão desta classificação de Brown, reunindo novamente aquelas duas famílias em uma só, na família Apocynaceae s.l. Na atual classificação, a família Apocynaceae está dividida em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae e Secamonoideae (Endress; Bruyns, 2000).

Os representantes da família Apocynaceae geralmente são arbustos ou árvores latexcentes, eretos ou escandentes, trepadeiras, raramente ervas. O látex geralmente é leitoso, às vezes claro, raramente amarelo ou vermelho. As folhas são simples e inteiras, normalmente pecioladas, raramente sésseis, geralmente opostas, raramente alternas ou verticiladas, geralmente sem estípulas. Quase sempre apresentam coléteres na base da lâmina foliar ou no pecíolo. As inflorescências são cimosas, racemosas ou raramente flores solitárias. As flores são gamopétalas, actinomorfas ou ligeiramente zigomorfas, quase sempre pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas. A corola é tubulosa, infundibuliforme ou hipocrateriforme. Os cinco estames são epipétalos, com anteras justapostas à cabeça estigmática. O ovário é súpero (semi-ífero em *Himatanthus* e *Apocynum*), apocárpico ou sincárpico, em geral com disco nectarífero, inteiro, lobado, ou com até cinco nectários livres, bicarpelar, portando óvulos numerosos. Fruto seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos (cada qual resultante do desenvolvimento de um carpelo), secos, deiscentes. O fruto é folicular ou drupoide, raro bacáceo. Sementes aladas, pilosas ou não (Koch, 1994; Joly, 1998; Endress; Bruyns, 2000).

De acordo com Endress & Bruyns (2000), os gêneros *Himatanthus* e *Rauvolfia* pertencem à subfamília *Rauvolfioideae*. Esta subfamília caracteriza-se por apresentar entre seus representantes árvores, arbustos, lianas lenhosas e vinhas, raramente ervas. O látex geralmente é leitoso. As folhas são opostas, espiraladas ou alternas. O ovário é sincárpico ou apocárpico; os frutos são deiscentes ou indeiscentes. Do ponto de vista químico, alcaloides indólicos geralmente estão presentes, e em menor proporção, iridoídes glicosilados e cardenólídeos são também encontrados.

1.3. GÊNERO *Himatanthus* Willd. ex Schult.

Na família Apocynaceae as espécies do gênero *Himatanthus*, encontrado exclusivamente no continente sul-americano, destacam-se tanto pelo seu difundido uso como planta medicinal quanto pela diversidade de compostos farmacologicamente ativos encontrados. O nome do gênero *Himatanthus* deriva de uma expressão grega que significa “manto-de-flor”, referindo-se às brácteas que envolvem os botões florais das espécies (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

Durante muito tempo, espécies do gênero *Himatanthus* foram consideradas como sendo do gênero *Plumeria*, devido a ausência de diferenças morfológicas evidentes e critérios taxonômicos (Ducke, 1955). No entanto, atualmente reconhece-se que caracteres anatômicos como brácteas grandes envolvendo os botões florais e estruturas secretoras multicelulares são únicos e exclusivos do gênero *Himatanthus* e são de fundamental importância na distinção entre *Himatanthus* e *Plumeria*. Outra característica usada para diferenciar o gênero *Himatanthus* é a ausência de estruturas secretoras no ápice das lacínias² do cálice das flores. Woodson, em 1938, foi o primeiro a constatar a importância destes caracteres na distinção entre os dois gêneros, o que o levou a propor a sinonimização e a transferência das espécies de *Plumeria* da América do Sul para o gênero *Himatanthus* (Plumel, 1991; Spina, 2004).

Atualmente, sob aspecto botânico, o gênero *Himatanthus* é classificado dentro da tribo Plumerieae E. Mey. Esta tribo é descrita por apresentar árvores ou arbustos, com látex leitoso; folhas geralmente alternas, às vezes opostas; coléteres calicínicos ausentes ou presentes; ovário sincárpico ou apocárpico, hemi-inferior em *Plumeria*, *Himatanthus* e *Mortoniella*; fruto deiscente com par de folículos ou indeiscente e drupáceo. Apresentam na maioria das vezes cardenolídeos ou iridoides glicosilados. Outros gêneros incluídos nesta tribo são *Allamanda*, *Anechites*, *Cameraria*, *Cerbera*, *Cerberiopsis*, *Mortoniella*, *Plumeria*, *Skytanthus* e *Thevetia* (Endress; Bruyns, 2000).

² Segmentos longos, estreitos e pontiagudos da margem de alguns órgãos. Neste caso, encontram-se nas sépalas, que em conjunto, constituem-se no cálice floral.

1.3.1. Composição química

Há poucas citações na literatura descrevendo a constituição química e as propriedades biológicas das espécies de *Himatanthus* (Barreto et al., 1998, Rattmann et al., 2005). O gênero destaca-se principalmente pela presença de alcaloides, iridoides e ésteres triterpênicos, isolados principalmente das cascas do caule, mas também presentes em menor quantidade no látex, nas folhas e nas raízes.

Já foram identificados nas cascas do caule de *H. succuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, os iridoides alamandina, plumericina, isoplumericina, β -di-hidroplumericina, 15-desmetilisoplumierídeo, 15-desmetilplumierídeo, plumierídeo (o iridoide majoritário no látex) e isoplumierídeo (Endo et al., 1994; Silva et al., 1998; Wood et al., 2001; Morel et al., 2006; Souza et al., 2006; Barreto et al., 2007; Castillo et al., 2007; Silva et al., 2007), o triterpeno lupeol e os ésteres triterpênicos cinamato de lupeol, acetato de lupeol, β -fenilpropionato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de β -amirina (Silva et al., 1998; Wood et al., 2001; Souza et al., 2006). Também foram isolados das cascas do caule, os depsídeos ácido confluêntico e ácido 2'-O-metilperlatólico, substâncias comumente encontradas em líquens; além do iridoide ácido β -di-hidro-plumericínico, e também os ácidos vanilínico, *p*-cumárico e *p*-hidroxi-benzoico (Endo et al., 1994). No látex de *H. succuba* foram identificados o polímero *cis*-poli-isopreno e a presença dos açúcares arabinose, glucose, xilose, ramnose e galactose (Silva et al., 2003).

Das folhas, cascas do caule e látex de *H. articulata* (Vahl) Woodson foram isolados os iridoides plumericina e isoplumericina, estigmasterol, sitosterol, ácido ursólico (o composto majoritário das folhas), cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina, acetato de lupeol e cinamato de lupeol, o carboidrato metilmioinositol e cicloartenol (Barreto et al., 1998). Cinamato de lupeol ainda foi identificado nas cascas caulinares de *H. drasticus* (Mart.) Plumel (Colares et al., 2008). O iridoide lactônico ácido β -di-hidroplumericínico foi também caracterizado nas raízes de *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson (Veloso et al., 1999). Do caule de *H. fallax* (Müll. Arg.) Plumel, além dos iridoides plumericina, isoplumericina e plumierídeo, foram isoladas as lignanas pinosinol, matairesinol e 7(*R*)-metoxi-8-*epi*-matairesinol (Abdel-Kader et al., 1997). Das folhas e cascas do caule de *H. obovatus* (Müll. Arg.) Woodson foram isolados *nor*-isoprenoides, o iridoide plumierídeo e a lignana isolariciresinol, não sendo detectada a presença de alcaloides (Lima et al., 1998).

1.3.2. Atividades farmacológicas

Com relação às atividades biológicas, as espécies do gênero *Himatanthus* possuem diversas indicações populares para o tratamento de várias enfermidades, porém foram pouco estudadas cientificamente a fim de comprovar tais efeitos terapêuticos. O Quadro 1 apresenta algumas espécies do gênero e suas respectivas atividades farmacológicas ou indicações populares relatadas na literatura científica.

Quadro 1. Atividades farmacológicas e indicações populares de espécies do gênero *Himatanthus*.

Espécie	Parte utilizada	Ação farmacológica ou indicação popular	Referência
<i>H. attenuatus</i>	folhas	citotoxicidade contra células tumorais de leucemia promielocítica aguda	Suffredini et al., 2002
		inibição da glucose-6-fosfatase em microssomos; diminuição da pressão arterial sem alteração da frequência cardíaca; letalidade significativa contra larvas de <i>Artemia salina</i>	Jiménez et al., 2001
<i>H. bracteatus</i>	folhas	indicação indígena como antipirético	Castillo et al., 2007
<i>H. drasticus</i>	látex	indicação popular para tratamento de casos inoperáveis de câncer de pulmão e câncer linfático, vermes intestinais, febre, menstruação irregular, infertilidade feminina e úlceras gástricas	Lorenzi; Matos, 2008
<i>H. obovatus</i>	raízes	leishmanicida contra promastigotas de <i>Leishmania donovani</i>	Mesquita et al., 2005
	folhas e caules	inibição da replicação de células sanguíneas mononucleares periféricas	Souza-Fagundes et al., 2002
<i>H. sucuuba</i>	cascas do caule	indicação popular para tratamento de gastrites, hemorroidas e anemia	Endo et al., 1994
		tratamento de feridas externas; antibacteriana contra cepas de <i>Clostridium histolyticum</i> e <i>Bacterioides fragilis</i>	Neto et al., 2002
		aumento da permeabilidade capilar	Villegas et al., 1997
		citotóxica contra linhagens de células tumorais	Wood et al., 2001
		inibição da MAO-B	Endo et al., 1994
	látex	anti-inflamatória, redução da formação de edema	Miranda et al., 2000
cascas da raiz	inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos e de IFN- γ	Souza et al., 2006	

1.3.3. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson

Himatanthus lancifolius (sinonímias: *Plumeria lancifolia* Müll. Arg., *P. floribunda* Müll. Arg. (Tropicos, 2008), *H. bracteatus* (A. DC.) Woodson (Spina, 2004)) é um arbusto, com raízes muito compridas, caule latescente e casca acinzentada (Figura 1) (Corrêa, 1926). É uma espécie nativa do Brasil, abrangendo majoritariamente as regiões Nordeste e Sudeste, com uma incidência aproximada no Rio de Janeiro de 44%, em Minas Gerais de 36%, na Bahia de 12%, no Espírito Santo de 3%, em Alagoas de 2%, e em outros estados encontra-se distribuída a menos de 2% (Plumel, 1991). A espécie, que pode atingir de 2 até 10 m de altura, é encontrada desde o nível do mar até altitudes de 1200 m, ocupando preferencialmente áreas de Mata Atlântica, mas também ocorre em vegetações de capoeira, cerrado, caatinga e campos rupestres (Spina, 2004).

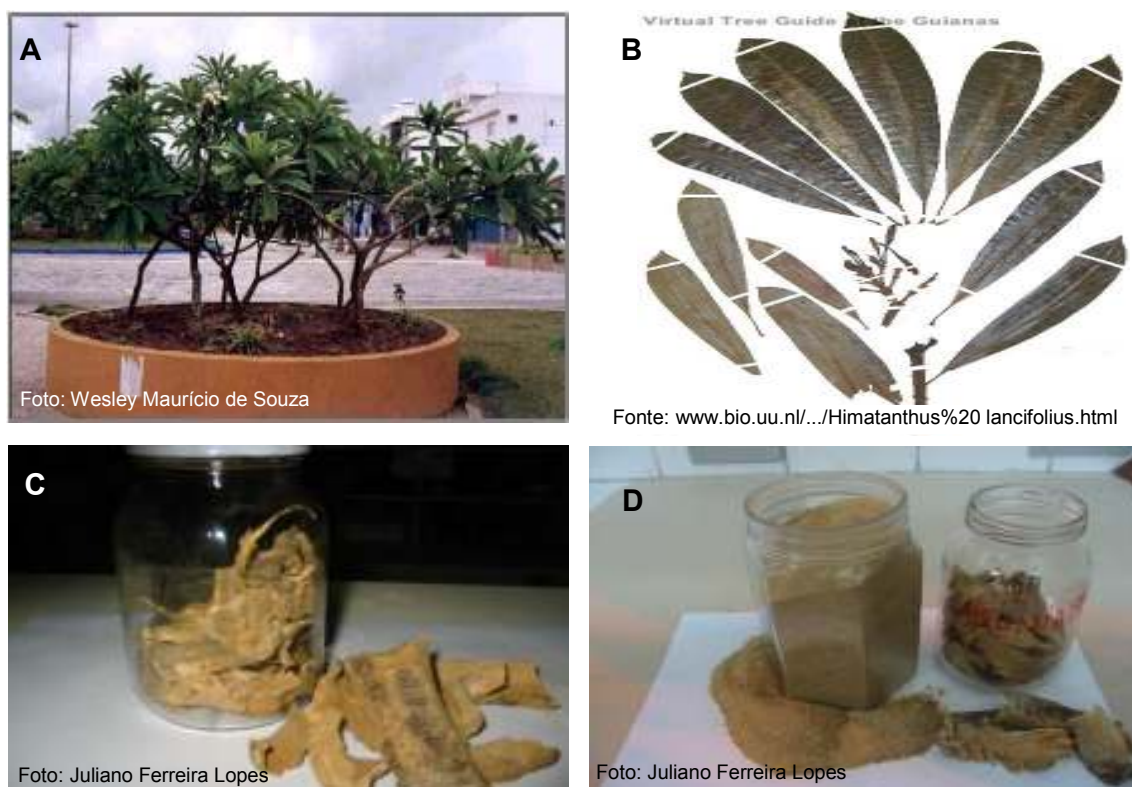
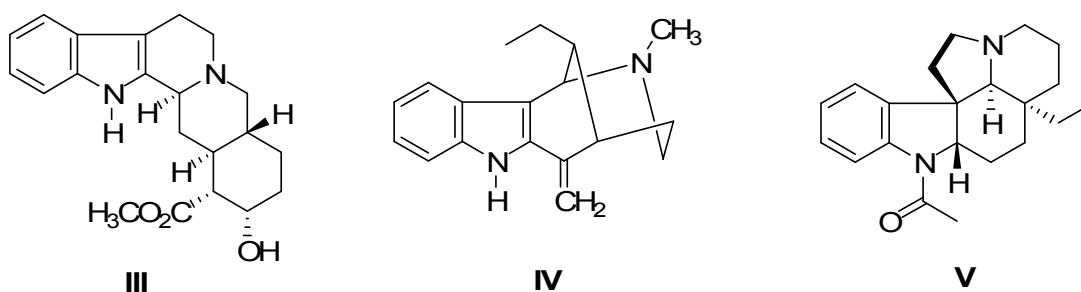


Figura 1. Aspectos botânicos de *H. lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson. Aspecto geral no hábito (A); folhas dessecadas (B); cascas caulinares íntegras (C) e moídas (D).

Himatanthus lancifolius está descrita na Farmacopeia Brasileira 1ª edição (1929), sob a antiga sinonímia de *P. lancifolia*. A monografia descreve que as partes utilizadas são as cascas do caule, usadas sob a forma de droga vegetal, extrato seco, extrato fluido e droga pulverizada (Brandão et al., 2006). A espécie,

popularmente conhecida como “agoniada”, mas também como “banana-de-papagaio”, “banana-de-macaco”, “cana-de-macaco”, “janaúba”, “leiteira”, “sucubinha”, “gamelina” e outros, tem suas cascas caulinares tradicionalmente utilizadas como antiasmática, purgativa, para tratamento de doenças de pele, sífilis e distúrbios menstruais, induzindo contrações uterinas (Corrêa, 1926). Outras indicações para as cascas incluem o tratamento de adenite, clorose, problemas digestivos, febre intermitente, histeria e como vermífugo (Brandão et al., 2009). O látex extraído do caule é considerado anti-helmíntico e febrífugo, enquanto que às folhas atribuem-se ainda propriedades galactogogas (Corrêa, 1926). A raiz é indicada para o tratamento de afecções do útero e dos ovários (Plumel, 1991).

As cascas do caule de *H. lancifolius*, que inclusive são matéria-prima para a produção de alguns fitoterápicos, caracterizam-se pela presença de alcaloides indólicos, dos quais já foram isolados ioimbina (III), uleína (IV) e demetoxiaspidospermina (V) (França et al., 2000; Souza, 2007; Lopes, 2008). Alguns estudos demonstraram que frações ricas em alcaloides indólicos das cascas de *H. lancifolius*, assim como os compostos isolados, mostraram-se significativamente ativas.



Verificou-se que a fração rica em alcaloides indólicos da espécie é ativa contra algumas linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans* e *Acinetobacter baumannii* (Souza et al., 2004). Também foi demonstrado que esta fração, cujo alcaloide indólico majoritário corresponde à uleína, foi capaz de provocar alterações nas respostas contráteis da musculatura lisa vascular e não-vascular, um evento que pode estar relacionado ao bloqueio da entrada de cálcio na célula, alterações na mobilização de cálcio

intracelular ou mesmo distúrbios na capacidade das células em usarem o cálcio para eventos contráteis (Rattmann et al., 2005).

A fração rica em alcaloides mostrou possuir ainda efeitos gastroprotetores através da ativação de vários mecanismos citoprotetores, incluindo antioxidantes enzimáticos, como o aumento da glutathione sintase (GHS) da mucosa gástrica, e antioxidantes não-enzimáticos, como o NO. A inibição da secreção ácida gástrica também foi verificada pelo bloqueio da bomba de H^+K^+ -ATPase, atividade esta relacionada aos alcaloides indólicos majoritários da fração, uleína e demetoxiaspidospermina (Baggio et al., 2005).

Foi verificado que a fração rica em alcaloides das cascas de agoniada e a uleína não possuem atividade antioxidante significativa e o efeito de ambas é inferior ao do ácido ascórbico, quando testados nos ensaios de redução do fosfomolibdênio e sequestro de radicais livres pela DPPH. Por outro lado, observou-se que a adição de concentrações crescentes de uleína ao cultivo de células endoteliais de aorta de coelhos e de células de melanoma de camundongos provocou um aumento na produção de NO. O aumento da produção de NO pela uleína pode justificar o uso popular das cascas como emenagogo e em distúrbios pós-menopausa, devido a atividade relaxante da musculatura lisa provocada pelos alcaloides de *H. lancifolius* (Souza et al., 2007). Foi observado que o extrato etanólico das cascas de agoniada não possui atividade inibitória sobre a proliferação de linfócitos, porém apresenta efeitos de natureza tóxica (Machado-Junior et al., 2006).

Nardin e colaboradores (2009) estudaram os efeitos anti-inflamatórios da fração clorofórmica rica em uleína de *H. lancifolius* sobre a migração de leucócitos induzida pela caseína, a adesão de fibronectina e vitronectina imobilizadas, e a expressão de integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$. A fração rica em uleína apresentou inibição significativa sobre a migração leucocitária, por meio da modulação de receptores opioides, e também sobre a adesão destas células, interferindo nas proteínas da matriz extracelular responsáveis pela adesão.

1.4. GÊNERO *Rauwolfia* L.

Em 1703, o botânico francês Charles Plumier nomeou o gênero *Rauwolfia* (grafado com **w**) em homenagem a um médico e explorador alemão do século XVI, Leonhard Rauwolf (1540-1596). Esta homenagem foi um pouco controversa, já que Rauwolf viajou apenas até o Oriente Médio, onde o gênero não é encontrado e

nunca trouxe qualquer exemplar de alguma espécie. O Código Internacional de Nomenclatura Botânica usa a grafia de Linneu, *Rauvolfia* (grafado com v) (Kreig, 1964).

O gênero está distribuído em todas as regiões tropicais do mundo, com cerca de setenta espécies, sendo estimadas trinta espécies para os paleotrópicos (regiões tropicais africanas e asiáticas) e 37 espécies para os neotrópicos (regiões tropicais americanas). O centro de diversidade das espécies de *Rauvolfia* localiza-se na América do Sul, com um total de 31 espécies, sendo 26 endêmicas. O Brasil é o país com o maior número de espécies do gênero, sendo ao todo vinte espécies identificadas e, destas, onze são endêmicas. Cuba aparece em segundo lugar, com cinco espécies descritas, três delas endêmicas (Koch, 2002; Carlos, 2007).

Botanicamente, o gênero *Rauvolfia* encontra-se classificado dentro da tribo Vinceae Duby, a qual compreende árvores ou arbustos, com látex leitoso, mais raramente lianas, vinhas ou ervas. As folhas são espiraladas ou opostas, raramente alternas; coléteres calicínicos ausentes; normalmente ovário apocárpico; fruto indeiscente, drupáceo. Alcaloides indólicos são os metabólitos característicos desta tribo, que ainda inclui gêneros como *Amsonia*, *Catharanthus*, *Kopsia*, *Neisosperma*, *Ochrosia*, *Petchia* e *Vinca* (Endress; Bruyns, 2000).

As espécies de *Rauvolfia* são subarbustos, arbustos ou árvores que possuem caracteristicamente ramos e folhas verticiladas, com 3-6 folhas por nó. As flores são geralmente pequenas e brancas, hipocrateriformes, e o ovário possui carpelos variavelmente sincárpico até apocárpico, mas sempre unidos pelo estilete no ápice. O fruto é drupáceo, com o desenvolvimento de um dos carpelos ou ambos, também variavelmente sincárpico com apenas uma semente por unidade. Diferencia-se dos gêneros mais próximos principalmente por características de seus frutos, sempre carnosos e indeiscentes, e número de sementes (uma por carpelo), além do formato do pólen, que possui geralmente espessamentos laterais. Algumas espécies do gênero, como *R. sellowii* e *R. grandiflora* Mart. ex A. DC., apresentam flores sem pólen em alguns indivíduos, um fenômeno conhecido como diclinia (Koch, 2002).

1.4.1. Composição química

O gênero *Rauvolfia* é composto por espécies que exibem uma complexa constituição química, caracterizadas principalmente pela presença de alcaloides

indólicos, basicamente com esqueletos carbônicos do tipo ajmalina, reserpina, ioimbina e outros que são importantes agentes terapêuticos. A maioria das espécies pertencentes ao gênero tem sido objeto de estudos, sendo que mais de 200 alcaloides já foram identificados (Mandinaveitia et al., 1995; Carlos, 2007).

A espécie mais estudada do ponto de vista químico é *R. serpentina* (L.) Benth. ex Kurz, que é um arbusto encontrado em países como Índia, Java, Paquistão e Tailândia e que possui mais de trinta alcaloides identificados (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002). As raízes de *R. serpentina* são consideradas uma fonte rica de vários alcaloides indólicos, aos quais atribuem-se as suas propriedades terapêuticas. Muitos alcaloides indólicos e di-hidroindólicos desta espécie têm sido utilizados como protótipos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares (Wachsmuth; Matusch, 2002). Além de alcaloides, o esteroide 7-deidrositosterol já foi isolado das raízes (Karmakar; Chakraborty, 1983).

Em 1953, foram identificados nas raízes de *R. serpentina* os alcaloides ajmalina, isoajmalina, neoajmalina, serpentinina, rauwolfina, reserpina e ajmalicina (Klohs et al., 1955). Décadas depois, Itoh e colaboradores (2005) identificaram adicionalmente nas raízes os alcaloides indólicos já conhecidos para a espécie - norajmalina, (+)-tetrafilicina, raucafricina, normacusina B, geissoschizol, razimanina, ioimbina, isorauimbina, 18-hidroxi-*epi-alo*-ioimbina, reserpato de metila, peracina, reserpinina, além dos glicosídeos ácido logânico, ácido 7-deoxilogânico, secoxiloganina, (+)-isolariciresinol 3α -*O*- β -*D*-glucopiranosídeo e glomeratose A. Por outro lado, isolaram pela primeira vez na espécie os alcaloides indólicos N_b -metilajmalina, N_b -metilisoajmalina, 3-hidroxisarpagina, ácido ioimbínico e ácido isorauimbínico, além dos glicosídeos 7-*epi*-loganina e 6'-*O*-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-glomeratose A.

Das raízes de *R. serpentina* também foram isoladas as bases anidras fortemente básicas: 3,4,5,6-tetraidroioimbina, 3,4,5,6-tetraidro-(*Z*)-geissoschizol, 3,4,5,6-tetraidrogeissoschizol, 3,4,5,6-tetraidrogeissoschizina-17-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo e serpentina; esta última com a capacidade de interagir com o DNA e com a topoisomerase II (Wachsmuth; Matusch, 2002).

Na década de 1980, Hanhinen & Lounasmaa (2001) supostamente identificaram nas raízes de *R. serpentina* o alcaloide indólico ajmalimina, que na verdade, após a identificação e atribuição espectral correta realizada pelos mesmos autores, tratava-se do composto (+)-17*R*-*O*-(3',4',5'-trimetoxibenzoil)-ajmalina. Este composto já foi identificado também em *R. vomitoria* e *R. obscura*.

Em vista da complexa composição química de *R. serpentina*, rica em alcaloides indólicos farmacologicamente ativos, outras espécies do gênero passaram a ser alvo de pesquisas químicas na busca de novos protótipos terapêuticos. A composição química de algumas espécies do gênero pode ser observada no Quadro 2.

A concentração de alcaloides varia entre as espécies de *Rauvolfia*, assim como nos diferentes órgãos do vegetal, concentrando-se principalmente nos caules e raízes. *Rauvolfia serpentina*, por exemplo, contém no mínimo 1% de alcaloides totais, enquanto que *R. vomitoria* Afzel., nativa da África, contém entre 0,7 a 2,4% de alcaloides totais, e *R. tetraphylla* L., originária do norte da América do Sul e da América Central, contém em torno de 7 a 10% (Schripsema et al., 2004; Carlos, 2007). Geralmente, em espécies de *Rauvolfia*, a síntese de alcaloides atinge um pico após quatro anos de crescimento e também sua constituição química varia de acordo com o clima e o solo (Sudha et al., 2003).

1.4.2. Atividades farmacológicas

As espécies de *Rauvolfia*, principalmente as americanas, possuem várias indicações de usos populares, muitas delas comprovadas por meio de ensaios farmacológicos (Koch, 2002), conforme relatado no Quadro 3. No entanto, de todas as espécies do gênero, a mais estudada e conhecida por suas propriedades medicinais é *R. serpentina*, que revolucionou a medicina e revigorou o interesse por moléculas de origem vegetal (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

Durante séculos, nativos africanos ingeriam um líquido amarelado com o intuito de afastar espíritos malignos. Este líquido amarelado, que na verdade era um chá preparado através da decocção das raízes de *R. serpentina*, era composto por reserpina (Kreig, 1964). Além dos nativos africanos, *R. serpentina* é utilizada pela medicina tradicional hindu – a Medicina Ayurveda – desde centenas de anos e tem sido objeto de pesquisas científicas na Índia desde 1931. Esta planta é relatada como uma droga para tratamento anti-hipertensivo e psiquiátrico na Índia (Goenka, 2007), além de ser indicada em casos de mordidas de serpentes e picadas de insetos, distúrbios mentais e epilepsia pela medicina hindu (Schripsema et al., 2004). Há relatos de indicações como antipirético, ocitotóxico, sedativo e contra dores de estômago, dores de dentes, vômitos, doenças de pele e olhos, diarreia e cólera, e ainda como anti-helmíntico (Bhatia, 1942; Kreig, 1964; Isharwal; Gupta, 2006).

Em 1940, o médico indiano Rustom Jal Vakil, considerado o “pai de *Rauwolfia*”, fez a primeira referência da aplicação terapêutica de *R. serpentina* em casos de hipertensão humana. Em 1941 e 1942, Chopra e colaboradores verificaram que a mistura de alcaloides totais, os extratos alcoólicos e a serpentina possuíam propriedades hipotensivas, enquanto que a ajmalina e serpentinina exibiam propriedades hipertensivas. O uso de *R. serpentina* em distúrbios mentais foi baseada nos seus efeitos sedativos distintos e benefícios em casos de epilepsia (Isharwal; Gupta, 2006).

Em 1953, Vakil relatou resultados promissores com a reserpina, o alcaloide de *R. serpentina* que foi isolado por químicos suíços em 1952. A partir daí, a espécie logo se tornou o agente hipotensivo mais usado na Índia e sua fama alcançou o ocidente. O americano Robert W. Wilkins foi o primeiro médico do ocidente a receitar comprimidos de *R. serpentina* para o tratamento da hipertensão (Kreig, 1964; Gupta, 2006; Goenka, 2007). Entre 1951 e 1955, a Índia exportou excessivamente as raízes secas ou sob a forma de comprimidos para outros dezessete países (Goenka, 2007), tanto que o governo indiano foi forçado a proibir a exportação da planta para evitar a sua extinção, sendo que pouco tempo depois ela passou a ser cultivada (Schripsema et al., 2004). Em 1957, *R. serpentina* foi aclamada por sua eficácia no tratamento de distúrbios mentais como esquizofrenia, paranoia, estados maníacos, e também em quadros de alcoolismo crônico e sintomas de confusão provocados por narcóticos (Kreig, 1964).

Quadro 2. Alcaloides indólicos identificados em algumas espécies do gênero *Rauvolfia*.

Espécie	Alcaloides indólicos	Local	Referência
<i>R. bahiensis</i> (Brasil)	picrinina, raucafrinolina, normacusina B, vinorina	folha	Kato et al., 2002
	norseredamina, seredamina, 10-metoxinormacusina, norpurpelina, purpelina, 12-metoxi- <i>N</i> _a -metilvelosimina, 12-demetoxipurpelina, 12-metoxiafinisina, 12-metoxivelosimina	casca do caule	
<i>R. biauriculata</i> (América Central)	locnerina, locvinerina, hidróxi-18-locnerina, gardnerina, hidróxi-18-gardnerina, hidróxi-21-cicloclocnerina, vomilenina, peracina, ajmalina, reserpilina, corinantina, ioimbina	folhas, caule e raízes	Abaul et al., 1986
<i>R. caffra</i> (África)	peracina, sarpagina, tetraidroalstonina, vomifolina, ajmalina e serpentina	folha	Habib; Court, 1974
	19,20-di-hidroacuamicina, vomilenina, acuamicina, acuamicina- <i>N</i> _b -óxido, estrictamina, sirsiricina, acuamidina, peracina, nor-harmano, raucafrinolina, normacusina B, peraksina, macrofilina, sarpagina, di-hidroperaksina, 21-deoxivomilenina, 17-acetil-19,20-di-hidro-vomilenina, 19-hidróxi- <i>N</i> _a -demetil- <i>N</i> _b -metilsuaveolina		Nasser; Court, 1983
<i>R. cumminsii</i> (-)	aricina, ajmalicina, reserpina, rescinamina, serpentina, 19- <i>epi</i> -serpentina, ioimbina, α -ioimbina, ésteres de 18-hidróxi-ioimbina	raiz	Iwu; Court, 1978
	ajmalicina, corinanteol, peraksina, aricina, reserpina, rescinamina, 10,11-dimetoxiajmalicina, norpurpelina, di-hidronorpurpelina, endolobina, purpelina, seredamina, nortetrafilicina, normacusina B, 18-hidróxi-ioimbina, deacetilpicralina, ioimbina, serpentina, 19- <i>epi</i> -serpentina	caule	
<i>R. grandiflora</i> (Brasil)	isoreserpilina, isoreserpina, darcyibeirina (<i>rel</i> - $\Delta^{19(18)}$ -reserpilina),	casca da raiz	Cancelieri et al., 2002
	β -ioimbina, 10-metoxireserpina, reserpina, rescinamina, vinorina		Carlos, 2007
<i>R. heterophylla</i> (América Central)	reserpina, ajmalicina, rauvolscina, ioimbina, ajmalina, serpentina, heterofilina, rescinamina, sarpagina	-	Hochstein et al., 1955
<i>R. linearifolia</i> (Cuba)	3- <i>epi</i> - β -ioimbina	raiz	Pèrez et al., 1991
<i>R. mattfeldiana</i> (Brasil)	isoreserpilina, peracina, vinorina, <i>N</i> _b -óxido-isoreserpilina, <i>N</i> _a -metilraufloina	casca da raiz	Carlos, 2007
	ajmalicina, isoreserpilina	folha	
<i>R. media</i> (Madagascar)	cabucina, reserpilina, mauiensina, 12-hidroximauiensina	casca do caule	Kan et al., 1986

Quadro 2. Continuação

Espécie	Alcaloides indólicos	Local	Referência
<i>R. nitida</i> (Índia)	tetrafilina, isoreserpilina, ajmalicina, isoreserpina, reserpilina, reserpina (0,034%), locnerina, 3-isoajmalicina, pseudoreserpina, serpentina, deserpidina, tetrafilicina, nortetrafilicina, normacusina B, ajmalina, suaveolina, ajmalidina, norajmalina, raucafrinolina, ioimbina, vellosimina, α -ioimbina, 11-metoxi-ioimbina, <i>alo</i> -ioimbina, 18-hidroxi-ioimbina, peraksina, sarpagina, alstonina, serpentina, acetil- <i>alo</i> -ioimbina, N_a -metilvellosimina, 17- <i>O</i> -acetilnortetrafilicina	casca da raiz	Amer; Court, 1981
<i>R. oreogiton</i> (África)	geissoschizina, aricina, acuamilina, picrinina, quaternina, 10-metoxiacuamina, picralina, pleiocarpamina, volkensina, acuamicina, sewerina, 10-metoxipleiocarpamina, nortetrafilicina, peraksina, normacusina B, 5-hidroximetilacuamilina, deacetilacuamilina, 1,2 β -di-hidroacuamilina, deacetil-1,2 β -di-hidroacuamilina, acetato de 19,20-deidrodirubina	folha	Akinloye; Court, 1980a
<i>R. schuelii</i> (Argentina)	aricina, reserpina, reserpilina, isoreserpilina, ajmalina	casca da raiz	Lacobucci; Deulofeu, 1957
<i>R. sessilifolia</i> (Brasil)	seredamina, reserpina, 18-hidroxi-ioimbina, 3- <i>epi</i> - α -ioimbina,	casca da raiz	Kato, 2001
<i>R. sprucei</i> (Brasil)	deserpidina, rescinamina, reserpilina, isoreserpilina	-	Mandinaveitia et al., 1995
	locnerina, 18-hidroxilocnerina, locneram, 18-hidroxi- <i>epi-alo</i> -ioimbina, compactinerevina, peracina	folha	
	locnerina, 18-hidroxilocnerina, locneram, espegatrina, 3- <i>epi</i> - α -ioimbina	caule	
<i>R. tetraphylla</i> (América Central)	reserpina, serpentina, tetrafilina, tetrafilicina, ajmalina e ψ -ioimbina	casca da raiz	Djerassi et al., 1957
<i>R. volkensii</i> (África)	tetraidroalstonina, geissoschizina, pleiocarpamina, 10-metoxipleiocarpamina, 10-metoxi-2,7-di-hidropleiocarpamina, quaternina (10,11-dimetoxi- N_a -metilpicrinina), volkensina (10,11-dimetoxipicrinina), sewarina (10-hidroxiacuamicina), 10-metoxi-pleiocarpamina- N_b -óxido, tetraidroalstonina- N_b -metil, nortetrafilicina, peraksina, normacusina B	folha	Akinloye; Court, 1980b
<i>R. vomitoria</i> (África)	tetraidroalstonina, aricina, isoreserpilina, reserpilina, carapanaubina, isocarapanaubina, rauvoxina, rauvoxinina, geissoschizol, desacetildesformoacuamilina, picrinina, acuamilina, deacetilacuamilina, peracina, raucafrinolina, normacusina B, peraksina, α -ioimbina, reserpina	folha	Amer; Court, 1980
	reserpilina	caule e raiz	

Quadro 2. Conclusão

Espécie	Alcaloides indólicos	Local	Referência
<i>R. vomitoria</i> (África)	10-metoxigeissoschizol, 10-hidroxigeissoschizol, sarpagina, normacusina B, purpelina, norpurpelina, norseredamina, nortetrafilicina, 10-hidroxiortetrafilicina, ioimbina, metilreserpato, 18-hidroxi-ioimbina, isoreserpilina, 19,20-deidroreserpilina, isoreserpilina- ψ -indoxil, carapanaubina, isocarapanaubina, rauvoxina, reserpilina, norseredamina	casca do caule	Sabri; Court, 1978
<i>R. yunnanensis</i> (China)	10-metoxi-16-de(metoxicarbonil)pagicerina, (5 β)-17-O-deacetil-5,11-dimetoxiacuamilina, (16S,19E)-N ¹ -(hidroximetil)isositsiricina, ajmalicina, reserpina, ajmalina, ioimbina, venoterpina, 19- <i>epi</i> -ajmalicina, (16R,19E)-isositsiricina	raiz	Hu et al., 2006
<i>R. weddelliana</i> (Brasil)	reserpilina, 18-hidroxi-ioimbina, normacusina B	casca da raiz	Kato, 2001
	ajmalicina	folha	

Quadro 3. Atividades farmacológicas de algumas espécies do gênero *Rauvolfia*.

Espécie	Parte utilizada	Ação farmacológica	Referência
<i>R. grandiflora</i>	casca das raízes	atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> , e também bactérias enterotoxinogênicas e metilicina-resistente	Carlos, 2007
<i>R. mattfeldiana</i>	casca das raízes e folhas		
<i>R. ligustrina</i>	partes aéreas	anticonvulsivante	Quintans-Júnior et al., 2007
<i>R. obscura</i>	casca das raízes	antiamebiana contra <i>Entamoeba histolytica</i>	Tona et al., 1998
<i>R. serpentina</i>	raízes	aumento da citotoxicidade de linfócitos T humanos ativados contra células tumorais humanas, como linfoblastomas e glioblastomas; aumento da sobrevivência de camundongos cancerosos	Jin et al., 2002
		aumento da expressão de proteínas HSP-70, relacionadas a elevar a tolerância das células a fatores de estresse e aumentar a síntese de IFN- γ e TNF- α em linfócitos T	
		tratamento da doença de Reynaud	Duke, 1997
<i>R. vomitoria</i>	raízes e látex da raiz	antibacteriana contra bactérias MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina) e MSSA (<i>S. aureus</i> susceptível à metilicina)	Pesewu et al., 2008
<i>R. vomitoria</i> (em associação com frutos de <i>Citrus aurantium</i>)	folhas e caules jovens	hipoglicemiante, cicatrizante, sedativo, antiulcerogênico	Campbell et al., 2006

1.4.3. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg.

A aclamação da reserpina durante a década de 1950, isolada das raízes de *R. serpentina*, despertou grande interesse e levou à investigação de outras espécies de *Rauvolfia* (Hochstein et al., 1955; Woodson, 1957; Cordell, 1981), entre elas *Rauvolfia sellowii*. Dentre as muitas espécies de *Rauvolfia*, especialmente as nativas da Mata Atlântica, *R. sellowii* foi pouco estudada sob aspectos químicos, farmacológicos e botânicos, culminando em poucas informações disponíveis sobre esta espécie.

Rauvolfia sellowii Müll. Arg. é popularmente conhecida por “casca-d’anta”, “jasmim-grado”, “jasmim-leiteiro”, “árvore-leiteira” ou ainda, no sudoeste do Paraná, por “pau-pra-tudo”. Em países como Paraguai e Argentina a espécie é conhecida como “kirandy”, “quina”, “quina del monte” e “paratudo”. A espécie, que é uma árvore de ocorrência rara que chega a alcançar 15 metros de altura e é nativa das florestas do Sudeste e do Sul do Brasil e também do leste do Paraguai e Norte da Argentina, tem as cascas do caule tradicionalmente utilizadas para reduzir os níveis de glicose e colesterol sanguíneos e possui também atividade antioxidante (Rech et al., 1998; Koch, 2002; Menezes et al., 2004; Silva et al., 2004), e suas raízes são utilizadas como anti-hipertensivo (Batista et al., 1996).

Rauvolfia sellowii, cujas cascas são também utilizadas no Paraguai para o tratamento da malária, é uma espécie considerada em perigo de extinção (Galindo-Leal; Câmara, 2005). Essa árvore é facilmente reconhecível em ambientes de mata úmida, floresta perenifólia, floresta pluvial, beira de florestas ou clareiras, por possuir folhas grandes (com cerca de 19 cm), pecíolos alongados (até 4 cm) em verticilos com entrenós curtos e pequenas flores brancas perfumadas em densas inflorescências. A espécie, que se adapta em altitudes variáveis (250-1000 m), floresce no final de agosto a fevereiro e frutifica de setembro a maio (Koch, 2002).

Em 1955, foram identificados nas cascas das raízes de *R. sellowii* os alcaloides indólicos ajmalina (VI) e aricina (VII), descritos como os componentes majoritários, além de reserpina (VIII), ajmalicina (IX) e tetraidroalstonina (X) (Hochstein, 1955). No mesmo ano, também foram descritos para as cascas das raízes os alcaloides π -tetraidroalstonina, tetrafilicina (XI) e ajmalidina (XII) (Pakrashi et al., 1955).

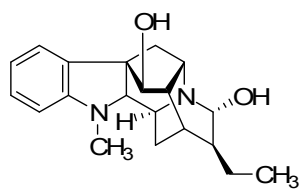
Décadas depois, foram identificados nas cascas da raiz outros alcaloides indólicos, como α -ioimbina (XIII) e β -ioimbina (XIV), reserpilina (XV), locnerina (XVI)

e ajmalinina, além da nitidita (Belem-Pinheiro et al., 1988 & Poser et al., 1990 *apud* Carlos, 2007).

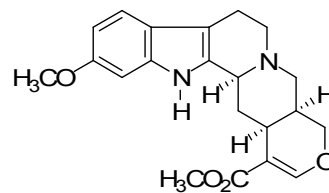
Das folhas de *R. sellowii* já foram identificados os alcaloides indólicos sellowiina (**XVII**) (que possui uma estrutura semelhante à suaveolina, um alcaloide indólico isolado de *R. suaveolens* S. Moore), raucafrinolina (**XVIII**), peracina (**XIX**), vomilenina (**XX**), picrinina (**XXI**), 12-demetoxitabernulosina (**XXII**) e 19 α ,20 α -epoxiacuamicina (**XXIII**) (Batista et al., 1996).

Do ponto de vista biológico, o extrato hidroetanólico de *R. sellowii* exibiu a capacidade de interferir na quimiotaxia de polimorfonucleares *in vitro*. A exposição de leucócitos humanos ao extrato hidroetanólico a 20% das cascas do caule de *R. sellowii* resultou na inibição da migração de polimorfonucleares, induzida por caseína, em todas as concentrações testadas (0,1-1000 μ g/ml). É possível que a atividade anti-inflamatória atribuída a *R. sellowii* possa estar em parte relacionada à sua capacidade de interferir nos mecanismos que envolvem o recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória (Presibella et al., 2003).

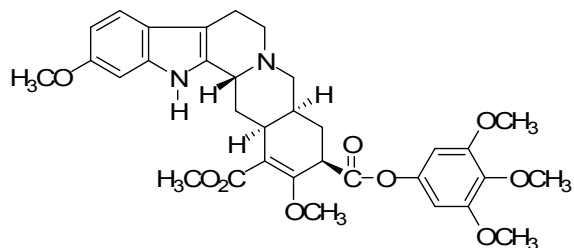
Verificou-se que em culturas celulares de nodos axiais das folhas de *R. sellowii*, os produtos de formação, no caso alcaloides indólicos, estavam associados ao crescimento, uma vez que a concentração de alcaloides aumentou com o aumento da massa celular. As culturas acumularam a maioria dos alcaloides descritos para a espécie cultivada em seu habitat natural: sellowiina, 19 α ,20 α -epoxiacuamicina, vomilenina, picrinina e 12-demetoxitabernulosina. Foi observado que a sellowiina acumulou-se em elevadas concentrações nas culturas. Este composto é um alcaloide do grupo suaveolina, previamente isolado em outras espécies de *Rauvolfia* e pode estar relacionado com a capacidade das culturas sintetizarem precursores apropriados, provavelmente do grupo ajmalina, ou ainda que o catabolismo na via específica é diminuído na cultura de células. Culturas de células de *R. serpentina* tratadas com ajmalina já foram relacionadas ao acúmulo de alcaloides do tipo suaveolina. Na suspensão de cultura de células de *R. sellowii*, o acúmulo de vomilenina, um precursor biosintético da ajmalina, poderia estar relacionado com a grande produção de sellowiina (Rech et al., 1998).



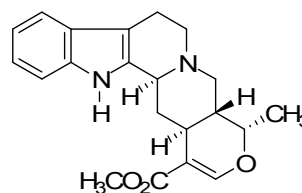
VI



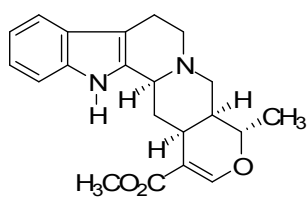
VII



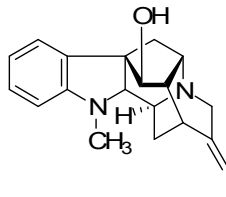
VIII



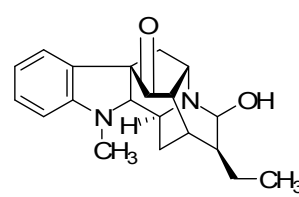
IX



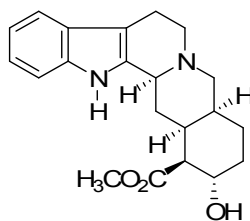
X



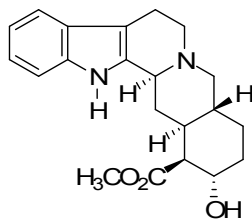
XI



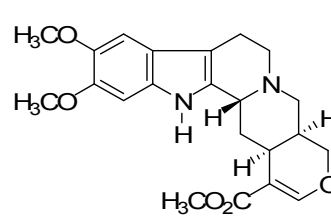
XII



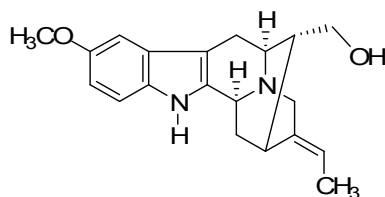
XIII



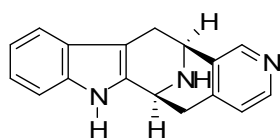
XIV



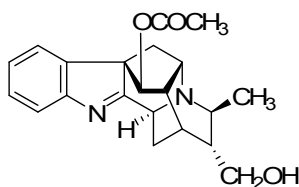
XV



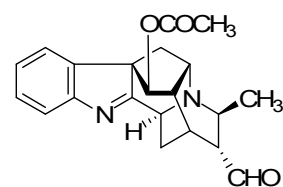
XVI



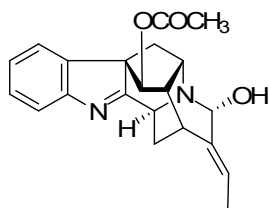
XVII



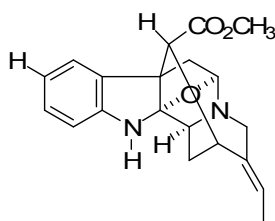
XVIII



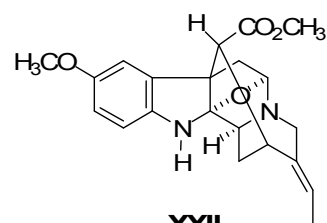
XIX



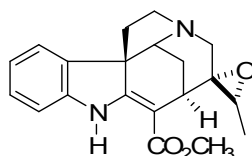
XX



XXI



XXII



XXIII

Observou-se que em culturas de células de *R. sellowii* foi possível a biotransformação de (+)- e (-)- α -pineno para ambos os enantiômeros da verbenona. Esta falta de especificidade pode refletir a transformação via peroxidases. *Rauvolfia sellowii* foi capaz de converter α -pineno para verbenona sem mudanças no centro estereogênico das moléculas. A verbenona é o composto aromático majoritário das essências de morango, framboesa, alecrim, aneto e hortelã, e seu preço de mercado é bastante elevado. Desta forma, a biotransformação de metabólitos por culturas de células vegetais poderia representar, entre outras vantagens, uma viabilidade econômica destes produtos (Limberger et al., 2007).

1.4.4. Reserpina

Durante muitos anos, os derivados de *Rauvolfia* desempenharam um papel importante na terapia anti-hipertensiva e também no tratamento de distúrbios mentais, antes de ser suplantado por outros agentes terapêuticos (Isharwal; Gupta, 2006). No entanto, até o início desta década, os alcaloides de *Rauvolfia* continuaram sendo bastante prescritos na Europa, principalmente a ajmalicina e a ajmalina,

usadas clinicamente como anti-hipertensivo e antiarrítmico, respectivamente, e a reserpina (Dewick, 2002).

No Brasil, entre todos os alcaloides de *Rauvolfia*, somente a reserpina era comercializada em associação com clortalidona (Higroton[®]) até 2009 (Brasil, 2009). Até o ano de 2002, a reserpina integrava a Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde na categoria de medicamentos anti-hipertensivos (WHO, 2002). Atualmente, a reserpina nunca é usada como primeira linha de tratamento da hipertensão e seu uso na esquizofrenia tornou-se obsoleto (Isharwal; Gupta, 2006).

O mecanismo de ação da reserpina é por meio do bloqueio das aminas biogênicas (dopamina, norepinefrina e serotonina) dentro das vesículas transmissoras, onde são armazenadas. A bomba de absorção provavelmente é Mg^{2+} e dependente de ATP. Este mecanismo acontece através de todo o organismo, incluindo o SNC, onde a reserpina depleta as catecolaminas nos neurônios de forma irreversível. A depleção dos estoques periféricos de catecolaminas acarreta nos efeitos anti-hipertensivos da reserpina. Já a depleção dos estoques de aminas centrais é responsável pelos efeitos colaterais, incluindo sedação, depressão e parkinsonismo. A depleção de dopamina que a reserpina provoca é responsável pelos sintomas do parkinsonismo, e tais efeitos podem ser terapêuticamente direcionados em casos de doença de Huntington (Isharwal; Gupta, 2006).

Entre os principais efeitos adversos da reserpina, podem ser citados hipotensão, depressão do SNC, sonolência e hipotermia. Como a depressão é um efeito relacionado com a dose, a menor dose possível deve ser administrada, sendo que não deve ser utilizada por pacientes com histórico de episódios depressivos ou úlcera péptica (Schripsema et al., 2004).

Após ser inicialmente aclamada e depois abandonada, a reserpina completou um ciclo. Agora compreende-se o mecanismo de ação, os efeitos esperados e as indicações da reserpina. No entanto, o surgimento de fármacos mais eficazes e mais seguros, com menos efeitos colaterais, fizeram o uso da reserpina tornar-se quase que esquecido (Isharwal; Gupta, 2006).

1.5. CONTROLE DE QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS

Os fitoterápicos vêm sendo, no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte,

principalmente pela magnitude da biodiversidade. Por outro lado, a qualidade das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos comercializados vem sendo afetada negativamente pelo aumento da demanda dos mesmos. Estudos têm demonstrado que cerca de 50% dos produtos fitoterápicos disponíveis no comércio brasileiro apresentam alguma irregularidade devido à presença de matéria orgânica estranha, sujidades e insetos, problemas de identificação botânica, teores de compostos químicos abaixo do especificado e adulteração (Reis et al., 2004).

A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade de um fitoterápico, assegurada por meio de metodologias analíticas. Muitas espécies vegetais possuem monografias em compêndios oficiais, como Farmacopeias, ou em monografias complementares, como aquelas elaboradas pela Organização Mundial da Saúde. No entanto, plantas nativas do Brasil geralmente foram pouco estudadas e carecem de descrições detalhadas de parâmetros que assegurem sua qualidade, evidenciando a importância da preconização destes parâmetros (Farias, 2004).

Políticas nacionais, na tentativa de assegurar a qualidade das drogas vegetais e seus produtos derivados, foram elaboradas durante esta década. Uma delas, como o Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006), tem como um de seus objetivos ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade. Já a Resolução RDC n. 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2004), estabelece que para a concessão de registro para a produção de fitoterápicos, a empresa solicitante deve apresentar para a droga vegetal, laudos de testes de autenticidade botânica (caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica) e de pureza e integridade (cinzas, cinzas insolúveis em HCl, umidade, pesquisa de matérias estranhas, pesquisa de contaminantes microbiológicos e de metais pesados), além de análise qualitativa e quantitativa (CCD, CLAE, UV, etc.) de princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie. A descrição destes testes com seus respectivos limites esperados geralmente é encontrada em monografias incluídas em compêndios oficiais, como as Farmacopeias.

Quando se recebe um lote de droga vegetal dessecada, ao invés de um extrato ou tintura, deve se proceder à análise botânica do material vegetal para sua correta identificação (Bacchi, 1996). Estudos botânicos têm como objetivo a

identificação inequívoca de uma espécie vegetal, através da análise de características anatômicas e morfológicas, procurando destacar aquelas consideradas peculiares de uma determinada espécie e que, em última instância, estejam presentes na matéria-prima vegetal. Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar a presença de uma ou mais espécies adulterantes (Sonaglio et al., 2004).

Os estudos químicos, por sua vez, compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, responsáveis ou não pela ação biológica. Esses ensaios permitem identificar a espécie vegetal e, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias ativas. Outra aplicação consiste no estabelecimento de marcadores químicos que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológicas e para o estudo de estabilidade dos produtos intermediários e final. Nesse sentido, o conhecimento da estrutura química tem especial relevância no caso de substâncias facilmente degradáveis por fatores tais como luz, calor e solventes, atrelados ao processo tecnológico, principalmente as classes de polifenóis como taninos, flavonoides e cumarinas, e também compostos heterocíclicos (Sonaglio et al., 2004).

Por sua vez, os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e do produto final, o fitoterápico, assegurando assim a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (Sonaglio et al., 2004).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação. Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se, portanto, de um termo não-específico. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (Brito et al., 2003).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: validação no laboratório e validação completa. A validação no laboratório (“*in house validation*”) consiste de todas as etapas de validação - exceto pela reprodutibilidade - dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação completa envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo, tornando-a desta forma oficial para uma determinada aplicação (Ribani et al., 2004).

A legislação, no que diz respeito à validação de metodologias, tem várias nuances e diferentes interpretações. Parte desta característica é intencional, pois permite a adaptação para cada tipo de problema. A legislação brasileira tem sido melhor definida através de resoluções e recomendações da ANVISA e INMETRO, inspiradas em diretrizes da ICH e do grupo EURACHEM. Todos estes documentos oficiais que regulamentam o processo de validação possuem, cada um, parâmetros de desempenho e limites específicos para cada situação (Ribani et al., 2004).

No Brasil, a Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003), regulamenta o “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. De acordo com esse guia, testes quantitativos para a determinação do princípio ativo e/ou marcador em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, são classificados na categoria I, a qual exige uma série de ensaios para a validação do método analítico. A categoria II engloba os testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação; a categoria III classifica os testes de performance, como dissolução e liberação do ativo; e a categoria IV especifica os testes de identificação.

A RE n. 899 não é específica para drogas vegetais e fitoterápicos, porém contempla todos os parâmetros necessários para a validação de um método analítico. No entanto, algumas vezes os valores mínimos estipulados para cada parâmetro da validação não são alcançados, em virtude da complexidade química das matérias-primas vegetais e derivados. Faz-se necessário uma atualização desta resolução ou criação de um guia próprio para a validação de métodos analíticos para drogas vegetais e derivados, onde a faixa de valores de cada parâmetro considerasse a complexidade química deste tipo de material.

Segundo a RE n. 899 (Brasil, 2003), os parâmetros necessários para a validação de métodos analíticos incluídos na categoria I, são descritos abaixo:

I) Especificidade/Seletividade: é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, deve-se tomar precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (e.g., com auxílio de DAD ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

II) Linearidade: é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco presente nas amostras.

III) Intervalo: é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, que devem estar pelo menos entre 80 a 120% da concentração teórica.

IV) Limite de detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

V) Limite de quantificação: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas.

VI) Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

1) Repetibilidade (precisão intracorrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

2) Precisão intermediária (precisão intercorridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

3) Reprodutibilidade: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente

aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em Farmacopeias.

VII) Exatidão: é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, ou seja, é a medida de quão perto está o valor encontrado do valor verdadeiro.

VIII) Robustez: é a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal.

Tendo em vista o exposto, *H. lancifolius* e *R. sellowii* são plantas nativas brasileiras, pouco estudadas até o momento e carecem de estudos químicos, botânicos e, sobretudo, farmacológicos, que confirmem e assegurem as suas indicações populares na medicina tradicional. Em um contexto farmacêutico, não há uma caracterização farmacognóstica ou parâmetros de qualidade descritos na literatura para estas duas espécies medicinais, o que demonstra a importância da descrição morfoanatômica e do estudo químico-analítico destas drogas vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as espécies *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson e *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. (Apocynaceae) sob aspecto químico, analítico e morfoanatômico, buscando estabelecer parâmetros que possam ser utilizados para a caracterização farmacognóstica destas drogas, contribuindo com o controle de qualidade.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar morfoanatomicamente as folhas, caules e cascas caulinares de ambas as espécies.

Realizar o isolamento e a elucidação estrutural de compostos das cascas caulinares de *H. lancifolius*, procurando identificar principalmente alcaloides indólicos.

Realizar o desenvolvimento e a validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar reserpina em cascas caulinares de *R. sellowii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para o estudo da morfoanatomia foliar e caulinar de *H. lancifolius*, foram utilizados folhas e fragmentos de caule e casca coletados de um espécime localizado em uma reserva florestal situada no Campus da Universidade Federal da Bahia (UFBA), bairro Ondina, em Salvador, Bahia (13° 00' S; 38° 30' O; 16 m), em janeiro de 2009. Uma exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da UFBA, sob o registro ALCB 87017. Para o estudo fitoquímico, cascas do caule de *H. lancifolius* foram adquiridas no mercado formal de plantas medicinais na região metropolitana de São Paulo (SP) e a identificação botânica do material vegetal foi realizada através de análise farmacognóstica segundo as especificações da Farmacopeia Brasileira 1ª edição (1929) e por comparação com o material autenticado, por meio de análise macro e microscópica e cromatografia em camada delgada (CCD).

Foram coletados folhas e fragmentos de caule e casca de *R. sellowii* de um espécime localizado no antigo prédio de Farmácia da UFPR, no bairro Batel, em Curitiba, Paraná (25° 26' S; 49° 16' O; 923 m), em janeiro de 2009. Uma exsicata do material vegetal está depositada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba sob o registro MBM 348509.

3.2. ESTUDO MORFOANATÔMICO DAS FOLHAS, CAULES E CASCAS CAULINARES DE *H. lancifolius* E *R. sellowii*

Para o estudo da morfologia foliar externa foi adotada a classificação de Hickey (1974).

3.2.1. Preparo do material

Folhas adultas, entre 5 e 20 cm do ápice, e fragmentos de caule e casca caulinar de *H. lancifolius* e *R. sellowii*, foram fixados em FAA 70 (etanol 70%, ácido acético e formaldeído; 90:5:5; v/v/v) durante sete dias (Johansen, 1940) e posteriormente armazenados em etanol a 70% (Berlyn; Miksche, 1976).

3.2.2. Preparo de lâminas

A anatomia foi estudada por meio de lâminas semipermanentes e permanentes, preparadas com cortes de fragmentos de caule e casca, do terço inferior da folha, e do pecíolo.

Lâminas semipermanentes foram confeccionadas com material seccionado à mão livre, com auxílio de isopor como suporte e lâminas de barbear, nos sentidos longitudinal e transversal. Os cortes foram corados com azul de Astra e fucsina básica, montados em glicerina a 50%, empregando-se esmalte para vedação (Roeser, 1972). Para o preparo de lâminas permanentes, foi utilizada a técnica de inclusão em glicolmetacrilato, utilizando o material vegetal previamente fixado em FAA. A desidratação foi realizada em série etanólica, submetendo os cortes inicialmente a álcool 80% e após duas horas, a álcool 95%. Em seguida, os cortes foram submetidos a pré-infiltração com álcool 95% e resina a vácuo. O material vegetal foi infiltrado, por quatro dias, em glicolmetacrilato (Leica Historesin[®]) e finalmente emblocado. O material emblocado foi seccionado no plano transversal em micrótomo rotatório Olympus CUT 4055 (Laboratório de Botânica Estrutural, Departamento de Botânica, UFPR) para obtenção de cortes extremamente finos, com aproximadamente 7 a 30 µm de espessura. Os cortes foram corados com solução aquosa de azul de toluidina a 5% e as lâminas foram montadas com solução de tolueno (Permout[®]) (Beçak; Paulete, 1976; Kraus; Arduin, 1997). Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias em microscópio fotônico Olympus BX-40 acoplado à unidade de controle PM-20 (Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, UFPR) e por meio de desenhos esquemáticos.

3.2.3. Testes microquímicos

Testes microquímicos foram realizados de acordo com Berlyn & Miksche (1976) e Oliveira e colaboradores (1991), com o material seccionado transversalmente a mão livre, empregando-se soluções reagentes específicas para a confirmação de estruturas e compostos celulares. Foram utilizadas soluções de H₂SO₄, para confirmação da natureza química de cristais de oxalato de cálcio; FeCl₃, para compostos fenólicos; floroglucina clorídrica, para lignina; glicerina iodada, para amido; e Sudan III, para substâncias lipofílicas.

3.3. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DAS CASCAS CAULINARES DE *H. lancifolius*

3.3.1. Preparo do extrato e fracionamento

Diferentes métodos de extração para drogas alcaloídicas foram testados, a fim de selecionar o que apresentasse maior rendimento. Os métodos reproduzidos encontram-se descritos resumidamente abaixo:

I) Foi utilizada uma proporção de droga e etanol de 1:10 (*m/v*), e alcalinizou-se a mistura até pH 9,0 a 10,0 com NH_4OH . A droga foi então macerada por 48 h com agitação ocasional. O extrato resultante foi particionado com *n*-hexano (3x) e depois com CHCl_3 até reação negativa ao reagente de Dragendorff (Farmacopeia Brasileira 2ª ed., 1959).

II) A droga foi desengordurada em aparelho de Soxhlet por 4 h com *n*-hexano. As cascas desengorduradas foram maceradas a frio com solução aquosa de HCl 1% (*v/v*) por 48 h e extraídas até reação negativa ao reagente de Dragendorff. O macerado foi filtrado e concentrado até 1/5 do volume inicial. O extrato foi alcalinizado (pH 10,0, ajustado com NaHCO_3) e particionado com CHCl_3 até reação negativa ao reagente de Dragendorff (Souza, 2007).

III) Cerca de 2,0 g da droga foi submetida à decocção com 30 ml de solução aquosa de H_2SO_4 1% (*v/v*) durante 2 min. O sobrenadante foi centrifugado e alcalinizado com KOH 50% até pH 10,0, e posteriormente foi particionado com *n*-hexano e depois com CHCl_3 (3x), até reação negativa ao reagente de Dragendorff. Foi utilizada a proporção de 2,0 g de droga para 30 ml de solvente (Simões et al., 2006).

O método que apresentou maior rendimento extrativo foi este que segue descrito. As cascas caulinares de *H. lancifolius* foram secas em estufa a 40 °C e moídas em moinho de facas. O material vegetal dessecado e moído (1,74 kg) foi transferido para um percolador e extraído pela técnica de percolação com MeOH (pH 8,0 a 10,0, ajustado com NH_4OH). A extração foi realizada até completo esgotamento da droga vegetal, controlada pela reação negativa frente ao reagente de Dragendorff. O extrato bruto foi filtrado e concentrado até a evaporação total do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a uma temperatura inferior a 40 °C.

Posteriormente, o extrato bruto foi ressolubilizado com uma mistura de MeOH:H₂O (9:1, v/v), transferido para um funil de separação e particionado com três porções de *n*-hexano (3x 100 ml), com o intuito de remover compostos lipofílicos que poderiam interferir no processo de fracionamento pela formação de emulsão (Cordell, 1981). O resíduo aquoso desengordurado, ajustado para pH 8,0 a 10,0, foi extraído com CHCl₃ até reação negativa frente ao reagente de Dragendorff. A fração CHCl₃ rica em alcaloides indólicos resultante foi dessecada com Na₂SO₄ e concentrada em evaporador rotatório até a secura, fornecendo cerca de 37,0 g. O perfil cromatográfico desta fração pode ser observado na Figura 2.

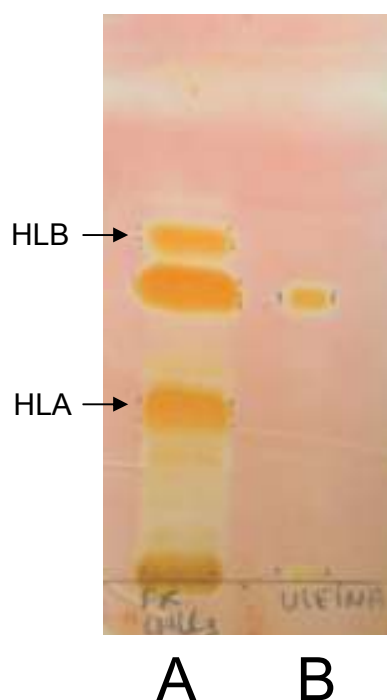


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato de *Himatanthus lancifolius* (A) em comparação com o padrão de oleína (B). *HLA* e *HLB*, compostos isolados desta fração. Fase móvel: tolueno:dietilamina (10:1, v/v); revelação: reagente de Dragendorff.

3.3.2. Isolamento

A fração CHCl₃ rica em alcaloides indólicos foi submetida a técnicas cromatográficas diversas, utilizando-se solventes de polaridade adequada, permitindo o isolamento de três compostos, os quais foram nomeados de *HLA*, *HLB* e *HLC* (Esquema 4).

3.3.2.1. Isolamento de HLA

Cerca de 521 mg da fração CHCl_3 foram submetidos a cromatografia em coluna CC1 (52 g de sílica gel 0,063-0,200 mm), utilizando como fase móvel uma mistura de *n*-hexano, AcOEt, MeOH e dietilamina, em gradiente, gerando 123 frações. Todas as frações foram analisadas por CCD e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. As frações 19 a 25, obtidas na proporção de *n*-hexano:AcOEt:MeOH:dietilamina (50:40:8:2, *v/v/v/v*), foram reunidas e a fração resultante (65,4 mg) foi evaporada à secura. Posteriormente, a fração resultante foi ressuspensa em MeOH a frio, e, por cristalização, obtiveram-se cristais de HLA. Estes cristais foram filtrados a vácuo e lavados com MeOH gelado, e finalmente dessecados em aparelho de Abderhalden, fornecendo 44,8 mg (8,6%) de HLA em peso seco.

3.3.2.2. Isolamento de HLB

Com 2,10 g da fração CHCl_3 foi realizada uma coluna a vácuo (CV1), utilizando sílica gel DG para CCD (tamanho de partícula máximo de 30 μm) e uma mistura de CHCl_3 e MeOH em gradiente (95:5 a 10:90) como eluente, obtendo-se quinze frações.

A fração 2 – CV1 (537 mg), a qual foi obtida com a proporção CHCl_3 :MeOH (95:5, *v/v*, 300 ml), foi submetida a cromatografia em coluna CC2 (43 g de sílica gel 0,063-0,200 mm), utilizando como solvente CHCl_3 com proporções crescentes de MeOH (0 a 5%, *v/v*, 50 ml), obtendo-se 68 frações. Todas as frações foram analisadas por CCD e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. As frações 1 a 10 (25,3 mg) foram reunidas e submetidas a CCD preparativa (tolueno:dietilamina, 10:1, *v/v*), permitindo o isolamento de 2,7 mg de HLB.

Com 1,64 g da fração CHCl_3 foi realizada uma nova coluna a vácuo (CV2) nas mesmas condições de CV1, gerando sete frações. A fração 2 – CV2 (CHCl_3 :MeOH, 95:5, *v/v*, 250 ml; 574 mg) foi submetida a cromatografia em coluna CC3 (50 g de sílica gel 0,063-0,200 mm), utilizando CHCl_3 com proporções crescentes de MeOH (0 a 3%, *v/v*, 50-350 ml) como solvente, gerando 87 frações. As frações 1 a 78 foram reunidas (54,4 mg) e submetidas a CCD preparativa (tolueno:dietilamina, 10:1, *v/v*), permitindo o isolamento de 15,5 mg de HLB.

A fração 3 – CV2 (CHCl₃:MeOH, 90:10, v/v, 250 ml; 906 mg) foi submetida a uma nova coluna a vácuo (CV3) nas mesmas condições de CV1, utilizando CHCl₃ com proporções crescentes de MeOH (0 a 5%, v/v, 100 ml) como solvente, gerando 12 frações. As frações 1 a 5 foram reunidas (213 mg) e submetidas a várias CCD preparativas (tolueno:dietilamina, 10:1, v/v), permitindo o isolamento de 19,2 mg de HLB.

Todas as amostras de HLB foram reunidas e dessecadas em aparelho de Abderhalden, totalizando 16,2 mg de HLB em peso seco.

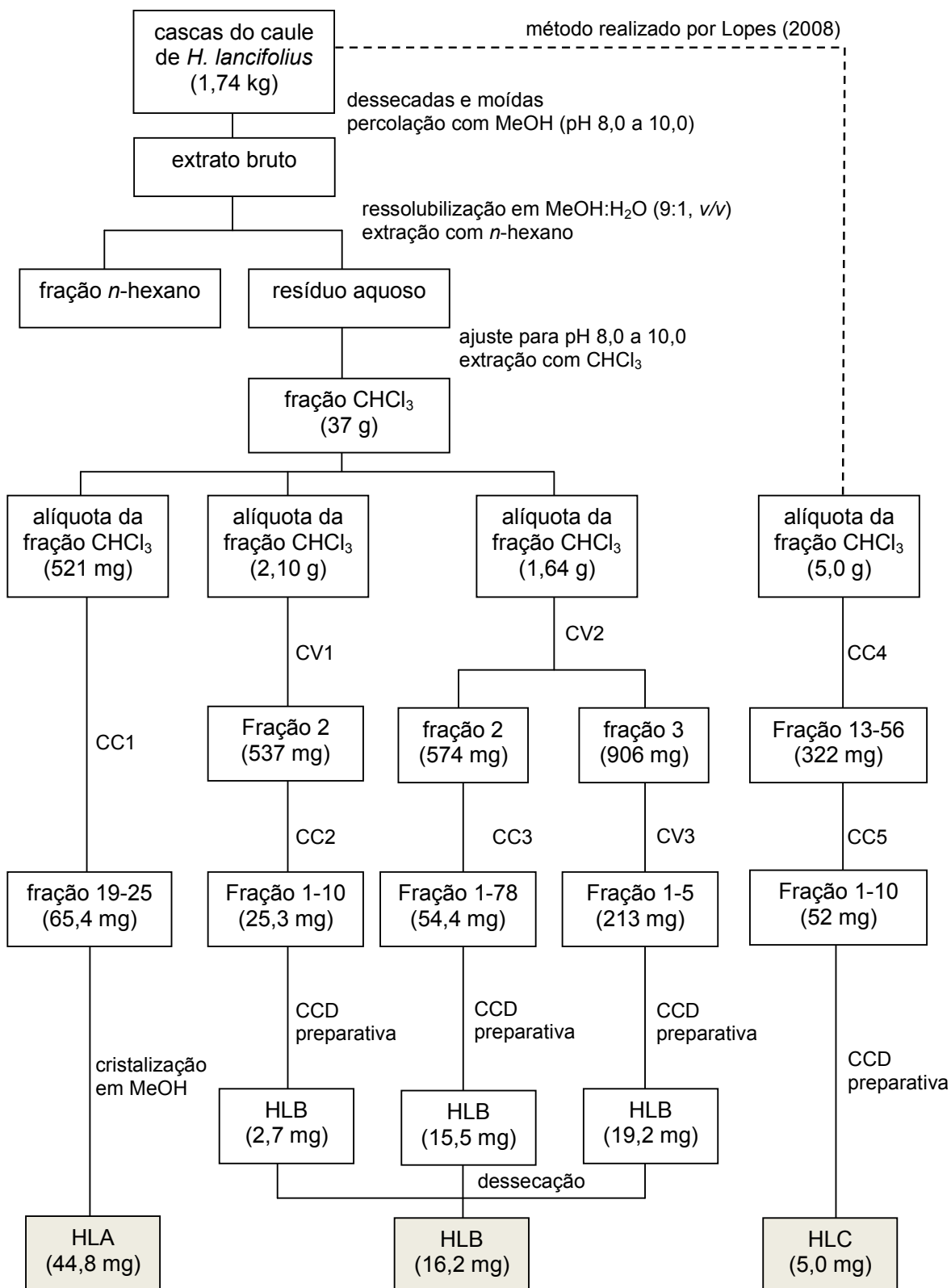
3.3.2.3. Isolamento de HLC

O isolamento de HLC foi realizado partindo-se de fração pré-existente no laboratório, previamente preparada por Lopes (2008) pelo mesmo processo de extração das cascas caulinares. Cerca de 5,0 g da fração CHCl₃ foram submetidos a cromatografia em coluna CC4 em sílica gel, utilizando misturas de diclorometano, CHCl₃, AcOEt e etanol como eluente, gerando 404 frações. As frações 13 a 56 foram reunidas (322 mg) e submetidas a uma nova cromatografia em coluna CC5, utilizando alumina como fase estacionária e misturas de diclorometano, CHCl₃ e MeOH como eluente, fornecendo 37 frações. As frações 1 a 10 foram reunidas (52 mg) e submetidas a CCD preparativa (tolueno:AcOEt:dietilamina, 70:20:10, v/v/v), permitindo o isolamento de 5 mg (0,1%) de HLC. A amostra foi dessecada em aparelho de Abderhalden.

3.3.3. Elucidação estrutural de HLA, HLB e HLC

Os compostos isolados HLA, HLB e HLC foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN-¹³C e RMN-¹H), ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM). Para a análise de RMN, foi utilizado um equipamento Bruker 200/52 DPX-200 no Departamento de Química da UFPR, e um equipamento Bruker-Advance DPX-300 no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (USP-RP). Para a análise de UV foi utilizado um equipamento Shimadzu UV-1601. Para a análise de EM foi utilizado um equipamento Applied Biosystems MDS Sciex API 3200 LC/MS/MS (quadropolo, modo positivo, electrospray - ESI) do Laboratório de Bioequivalência da UFPR. O ponto de

fusão de HLA foi verificado em Aparelho de Koffler sem correção modelo n. 317.402 (Reichert, Áustria).



Esquema 4. Processo de extração, fracionamento e isolamento de compostos das cascas caulinares de *Himatanthus lancifolius*.

3.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESERPINA EM CASCAS CAULINARES DE *R. sellowii*

3.4.1. Preparo do extrato

O extrato das cascas caulinares de *R. sellowii* foi preparado de acordo com o método preconizado pela Farmacopeia Americana (USP30-NF25, 2007) para doseamento de reserpina nas raízes de *R. serpentina*, porém com algumas adaptações do método extrativo. Foram pesados analiticamente 2,50 g de cascas caulinares moídas e dessecadas de *R. sellowii* (teor de umidade³= 6,52%; $n= 3$) e posteriormente extraídos com 100 ml de etanol 96° GL (pH 8,0 a 10,0, ajustado com NH_4OH) sob refluxo durante 4 h, protegendo sempre da luz. Após o refluxo, o extrato foi filtrado em algodão. O resíduo, juntamente com o algodão, foi extraído novamente com 100 ml de etanol sob refluxo durante 30 min, apresentando reação negativa frente ao reagente de Dragendorff. O extrato foi filtrado novamente em algodão e o filtrado resultante foi concentrado para 30 ml em evaporador rotatório. O extrato concentrado foi transferido para funil de separação, onde foi acidificado com 100 ml de H_2SO_4 0,5 N (v/v) e essa solução ácida foi extraída cinco vezes com porções de 30 ml de CHCl_3 , descartando-se a fase aquosa ácida ao final. A fase CHCl_3 resultante (0,327 g) foi extraída quatro vezes com porções de 30 ml de NaHCO_3 2% (m/v), descartando-se a fase aquosa. A fase orgânica foi levada a secura em evaporador rotatório e armazenada ao abrigo da luz. A Figura 3 ilustra o perfil cromatográfico da fração clorofórmica rica em reserpina.

3.4.2. Preparo da solução-amostra e das soluções-padrão

A solução-amostra foi preparada em triplicata, pesando-se 60,50 mg do extrato de *R. sellowii* (fase CHCl_3) e diluindo essa massa em balão volumétrico de 50 ml. Uma alíquota de 4,17 ml foi tomada e completada para 5 ml em balão volumétrico, gerando a solução-amostra na concentração de 1,0 mg/ml, sendo utilizada para os ensaios de validação e quantificação de reserpina na amostra.

A solução estoque do padrão de reserpina (Fluka[®], SQR, 99% de pureza) na concentração de 1,0 mg/ml foi preparada em triplicata. A solução estoque foi então

³ Teor de umidade calculado pelo método de perda por dessecação (Farm. Bras. 4ª ed., 1988; WHO, 1998).

apropriadamente diluída para obter uma solução de trabalho a 100,0 µg/ml, a qual foi utilizada para preparar as soluções-padrão da curva de calibração nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/ml.

Todas as soluções preparadas com o extrato das cascas de *R. sellowii* e com o padrão de reserpina, assim como as diluições subsequentes, foram dissolvidas em MeOH:acetonitrila grau HPLC (1:1, v/v), sonicadas por 5 min e posteriormente filtradas em filtro Millipore Millex PVDF 0,45 µm. As soluções do padrão de reserpina e do extrato foram preparadas momentos antes da sua utilização. As soluções foram injetadas em equipamento de CLAE em um volume de 20 µl e as análises foram realizadas em triplicatas.

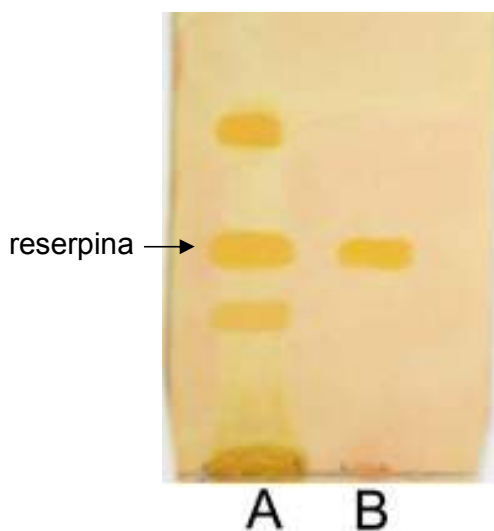


Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato de *Rauvolfia sellowii* (A), comparando com o padrão de reserpina (B). Fase móvel: tolueno:dietilamina (10:1, v/v); revelação: reagente de Dragendorff.

3.4.3. Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series, bomba quaternária modelo G1311, autoamostrador modelo G1329, degaseificador modelo G1379, detector ultravioleta DAD modelo G1315 e software Chemstation Rev. A. 10.02[1757]. Foi utilizada uma coluna Waters Spherisorb® (lote: 0161380931) em fase reversa ODS2 C18, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel foi filtrada em membrana filtrante Millipore PTFE 0,45 µm antes da análise cromatográfica.

3.4.4. Otimização do método analítico

Vários métodos para análise qualitativa ou quantitativa de alcaloides indólicos em extratos vegetais por CLAE descritos na literatura (Klyushnichenko et al., 1995; Gerasimenko et al., 2001; Sarker et al., 2001; Zhang; Dryhurst, 2001; Stöckigt et al., 2002; Tikhomiroff; Jolicoeur, 2002; Shoeb et al., 2005; Ding et al., 2007; Silva et al., 2007; Dhooghe et al., 2008; Niemenak et al., 2008) foram reproduzidos no laboratório, avaliando as condições cromatográficas sobre o extrato de *R. sellowii*. Os parâmetros cromatográficos foram inicialmente avaliados com uma solução do extrato (200,0 µg/ml) e também do padrão de reserpina (50,0 µg/ml). Foi selecionado o método que apresentou melhor separação e resolução dos picos e melhores condições de adaptação dos parâmetros. O método selecionado foi adaptado para as condições laboratoriais e otimizado em parâmetros como concentração da fase orgânica, pH da fase móvel, fluxo, temperatura e dimensões da coluna.

3.4.5. Validação do método analítico

O método otimizado, após a definição de todos os parâmetros, foi validado segundo as normas preconizadas pela RE n. 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003), consultando-se também as normas do INMETRO (INMETRO, 2007) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005).

3.4.5.1. Parâmetros avaliados

3.4.5.1.1. Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade do método foi demonstrada por meio da injeção de uma solução de extrato de *R. sellowii* a 1000,0 µg/ml e de uma solução de reserpina a 10,0 µg/ml, comparando-se a resolução e o tempo de retenção dos picos cromatográficos. Para confirmar que o tempo de retenção analisado correspondia à reserpina, recorreu-se ao método de adição de padrão à matriz. A pureza do pico referente à reserpina no extrato foi verificada com o auxílio de DAD ($\lambda = 200-400$ nm), com o intuito de confirmar que o pico de resposta era exclusivamente do composto de interesse.

3.4.5.1.2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio de três curvas de calibração, preparadas independentemente, contendo sete níveis de concentração: 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/ml. As soluções de cada curva foram injetadas em triplicata.

A média das injeções de cada ponto da curva foi obtida após integração dos picos referentes à reserpina, as quais foram plotadas em um gráfico de área do pico cromatográfico *versus* concentração com o auxílio do software OriginPro 8[®]. Os dados foram analisados estatisticamente através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e pela análise de variância (ANOVA), obtendo-se o coeficiente de correlação (r^2) e a equação da reta, com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2007.

3.4.5.1.3. Intervalo

O intervalo foi definido pelo parâmetro de linearidade e contemplou uma faixa de alcance de 80 a 120% da concentração teórica do teste (10,0 µg/ml; 100%).

3.4.5.1.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Estes limites foram obtidos a partir da análise de regressão da curva de calibração da reserpina e calculados matematicamente pelas seguintes expressões:

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{IC} \qquad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa= desvio padrão do intercepto (*b*) com o eixo do y de no mínimo três curvas de calibração.

IC= inclinação (*a*) da curva de calibração.

3.4.5.1.5. Precisão

Repetibilidade (precisão intracorrída)

Foram realizadas doze determinações da concentração de 10,0 µg/ml (a 100%) do padrão de reserpina, realizadas pelo mesmo analista e com a mesma instrumentação no mesmo dia, porém em ocasiões diferentes (seis determinações na corrida 1 e seis determinações na corrida 2). Foram registrados os valores referentes à área dos picos cromatográficos e dos tempos de retenção e o resultado foi expresso como desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR%).

Precisão Intermediária (precisão intercorridas)

Foram preparadas três novas soluções estoque de reserpina padrão a 1,0 mg/ml e a partir destas, três soluções de trabalho a 100,0 µg/ml foram preparadas, as quais originaram três soluções a 10,0 µg/ml. As injeções ocorreram em duplicata durante dois dias diferentes realizadas por um analista diferente utilizando a mesma instrumentação. Foram registrados os valores referentes à área dos picos cromatográficos e dos tempos de retenção e o resultado foi expresso como DP e DPR%.

3.4.5.1.6. Exatidão

A exatidão foi determinada pela técnica de adição de padrão por meio do teste de recuperação (Brasil, 2003; Ribani et al., 2004), adicionando-se concentrações conhecidas do padrão de reserpina ao extrato de *R. sellowii* (matriz). Foram adicionados à matriz diluída (1000,0 µg/ml) volumes do padrão de reserpina de modo a obter concentrações de 1,25, 5,0 e 10,0 µg/ml, considerando-se a linearidade do método. Cada solução foi preparada em triplicata e injetada três vezes, resultando em nove determinações (concentrações baixa, média e alta). O resultado foi expresso pelo percentual de recuperação da quantidade de analito conhecida adicionada à amostra e foi calculado pela seguinte equação:

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

3.4.5.1.7. Robustez

Para avaliar a capacidade do método de não ser afetado por pequenas e deliberadas variações e fornecer um indicativo de confiança para o uso rotineiro, foram realizados testes de variação do pH da fase móvel (pH = 4,9, 5,0 e 5,1) e temperatura da coluna (20, 25 e 30° C), relacionados com o tempo de retenção e resolução dos picos cromatográficos, injetando-se em triplicata a solução de reserpina padrão a 10,0 µg/ml a cada variação. Os resultados foram expressos como DPR% e analisados pelo teste *t* de Student ($\alpha= 0,05$), com um nível de confiança de 95%, para verificar se essas variações eram significativamente diferentes das condições originais selecionadas.

3.4.6. Quantificação de reserpina em cascas caulinares de *R. sellowii* por CLAE

A concentração de reserpina na amostra foi calculada com base na área do pico. Foram preparadas três soluções do extrato de *R. sellowii* (1000,0 µg/ml) e injetadas em CLAE, registrando-se os valores das áreas dos picos e calculando-se o teor de reserpina presente no extrato e na droga vegetal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ESTUDO MORFOANATÔMICO DAS FOLHAS, CAULES E CASCAS CAULINARES DE *H. lancifolius* E *R. sellowii*

4.1.1. Resultados

4.1.1.1. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson

4.1.1.1.1. Morfologia externa

As folhas (Figuras 4 e 5) são verde-amareladas a verde-claras em ambas as faces, mais claras na face abaxial. As folhas são simples, possuindo lâminas inteiras, simétricas, curto-pecioladas, glabras em ambas as faces, de textura cartácea a coriácea, e dispõem-se de forma alterna-espirlada, concentrando-se no ápice dos ramos. A forma da lâmina é obovado-lanceolada, com ápice acuminado, base aguda a decurrente. A margem é inteira formando uma linha ou arco suave sem projeções. A nervação é pinada⁴, camptódroma⁵ do tipo broquidódromo⁶, com as nervuras secundárias unindo-se em uma série de arcos proeminentes. Essas nervuras são imersas na face adaxial e evidentes na superfície abaxial, sendo a nervura central proeminente de forma reta, enquanto as nervuras secundárias têm ângulo praticamente reto.

Os ramos jovens são castanho-escuros e os mais velhos com manchas castanho-claras, latescentes. Os fragmentos da casca do caule (Figura 6) têm formato plano, superfície irregular, exibindo gretas ou fendas mais ou menos profundas na face externa, e lisa na face interna.

4.1.1.1.2. Anatomia da folha

No limbo, em vista frontal, as células da epiderme são revestidas por cutícula estriada (Figura 7), e apresentam contorno levemente ondulado e espessado na face adaxial (Figura 8) e ondulado na superfície abaxial (Figura 9). Os

⁴ Com uma única nervura central, que serve de origem.

⁵ As nervuras secundárias não terminam na margem.

⁶ As nervuras secundárias unem-se em uma série de arcos proeminentes.

estômatos são predominantemente do tipo anisocítico⁷, inseridos no mesmo nível das demais células epidérmicas, exclusivamente na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática, e são circundados por uma borda periestomática (Figuras 9 e 10).

No limbo, em secção transversal, a epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula mais espessa na face adaxial. O mesofilo é dorsiventral, composto de parênquima paliçádico, com cerca de dois estratos de células, relativamente mais alongadas e estreitas junto à face adaxial, sendo o primeiro estrato preenchido de forma regular e o segundo de forma irregular, formando meatos em toda a extensão, e de parênquima esponjoso, formado de várias camadas, correspondendo a 70-80% da altura do mesofilo. Há algumas células coletoras⁸, ligando-se a outras duas ou mais células do parênquima paliçádico. No mesofilo distribuem-se feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral⁹ e de médio porte do tipo bicolateral¹⁰, envoltos por bainha parenquimática (Figura 11).

Em secção transversal, a nervura central apresenta-se biconvexa, com ângulo aproximadamente agudo em ambas as faces. A epiderme é uniestratificada, revestida por cutícula espessada, formando flanges cuticulares¹¹. Seguem-se a ambas as faces, uma camada subepidérmica de células com conteúdo fenólico. O parênquima paliçádico interrompe-se gradualmente e observa-se o colênquima com espessamento anelar, composto de 9-10 camadas nas faces adaxial e abaxial (Figuras 12 e 13). No parênquima fundamental, existe um feixe vascular de grande porte do tipo bicolateral em formato de “V” (Figuras 13 e 15). Em direção à superfície adaxial, numerosos feixes vasculares bicolaterais de pequeno porte (Figuras 13 e 16) formam com o feixe maior um arranjo triangular (Figura 13). Esse arranjo triangular delimita uma região central preenchida por parênquima medular (Figura 13 e 14). O xilema é completamente lignificado, composto por elementos traqueais¹² dispostos em fileiras (Figura 17). O floema externo é constituído de uma faixa contínua em torno do feixe vascular e relativamente estreita em relação ao floema

⁷ Presença de três células subsidiárias, sendo uma delas geralmente menor que as outras duas.

⁸ Células que recebem os produtos sintetizados no parênquima paliçádico e os transmitem diretamente aos principais canais de translocação.

⁹ Feixe vascular que apresenta floema de um lado e no outro, apenas xilema.

¹⁰ Feixe vascular que apresenta floema em ambos os lados do xilema.

¹¹ Reentrâncias da cutícula entre as células da epiderme, como se fosse um “pente”.

¹² De um modo geral, células condutoras de água pertencentes ao tecido xilemático; relacionados a traqueídeo ou elemento de vaso.

interno. Os elementos crivados¹³ do floema interno situam-se em pequenos grupos em meio às células parenquimáticas, ocupando toda a região central na medula (Figuras 14-17). Uma bainha amilífera envolve o feixe vascular de grande porte (Figura 18).

O pecíolo, seccionado transversalmente, tende a ser circular, levemente achatado na face adaxial. O sistema de revestimento, a camada subepidérmica e os feixes vasculares são semelhantes à nervura central (Figuras 20-22). Lateralmente, a cada lado próximo à face adaxial, observa-se um feixe acessório do tipo anficrival¹⁴ (Figuras 20 e 23).

Idioblastos¹⁵ com conteúdo fenólico (Figuras 12-17, 20 e 21), que se coram em tons róseos pela fucsina básica e de azul pelo azul de toluidina, são também observados ao longo do mesofilo, no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo, e no floema. Laticíferos (Figuras 14, 15, 19 e 20) com paredes espessadas, citoplasma denso e conteúdo granular lipofílico, encontram-se no mesofilo e predominam no floema e no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo. Amiloplastos são também encontrados no parênquima fundamental do pecíolo (Figura 24).

4.1.1.1.3. Anatomia do caule e casca caulinar

Em secção transversal do caule (Figura 25), na região analisada, a epiderme permanece, em fase de destacamento. Esta é constituída de uma única camada de células, revestida por cutícula espessada (Figuras 26 e 27). Em decorrência do aumento da circunferência do caule, o felogênio¹⁶ instala-se nas camadas subepidérmicas. Este forma o súber em direção à periferia, que consiste de muitos estratos de células tabulares, com paredes suberizadas e levemente lignificadas (Figuras 25-27); ao felogênio, segue-se a feloderme¹⁷ e 4-5 camadas de células colenquimáticas (Figura 25). No córtex, observam-se células de paredes delgadas, de formatos e tamanhos irregulares, e numerosos laticíferos (Figuras 28 e 29).

¹³ Células do tecido floemático relacionadas principalmente com a condução longitudinal de material alimentar; classificados em célula crivada e elemento de vaso crivado.

¹⁴ Feixe vascular concêntrico, no qual o floema envolve o xilema.

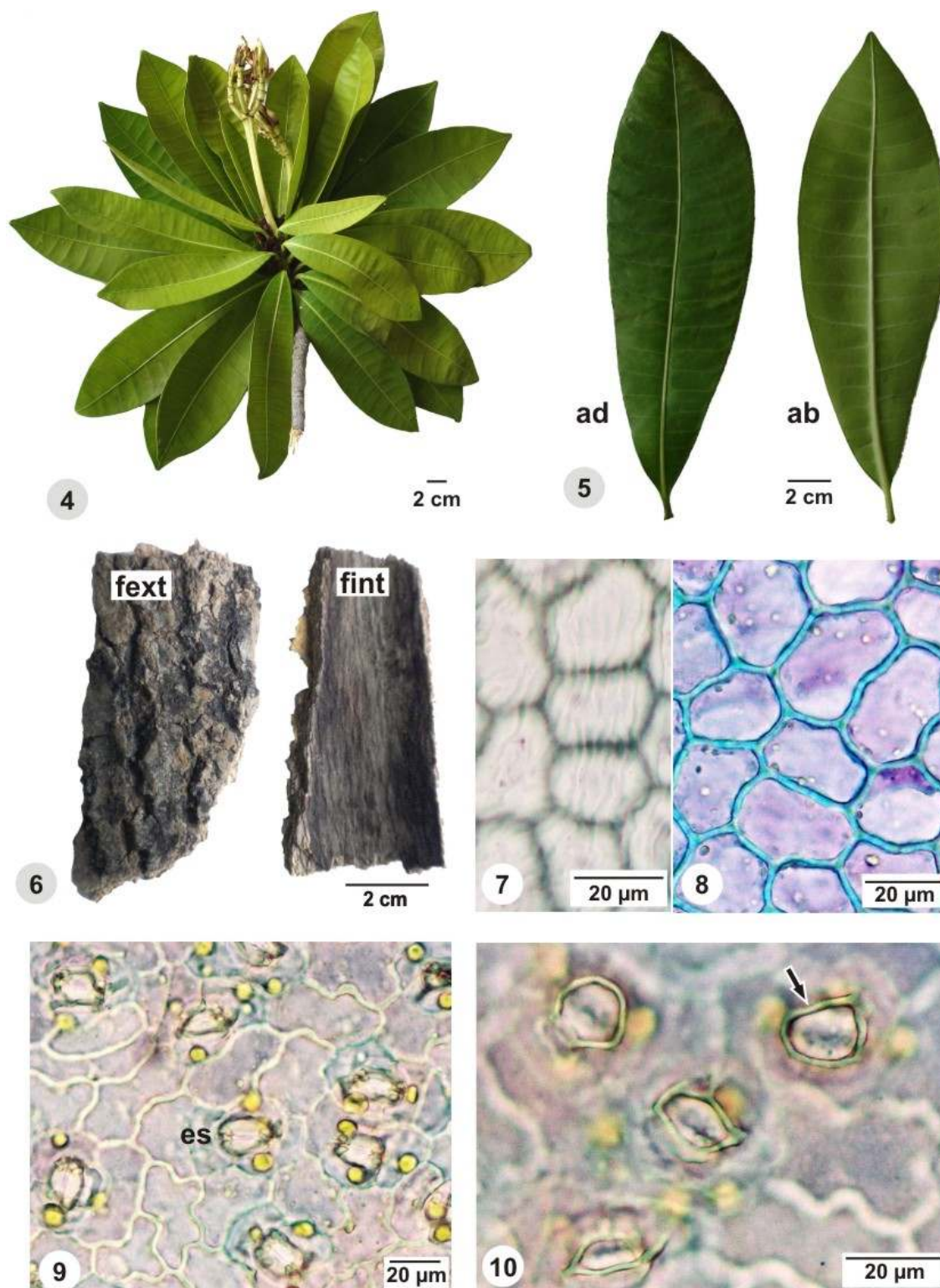
¹⁵ Células, em um tecido qualquer, que diferem das demais pela sua forma, tamanho, conteúdo, espessura da parede ou função.

¹⁶ Tecido meristemático que origina o súber em direção à superfície e a feloderme em direção ao interior; câmbio da casca.

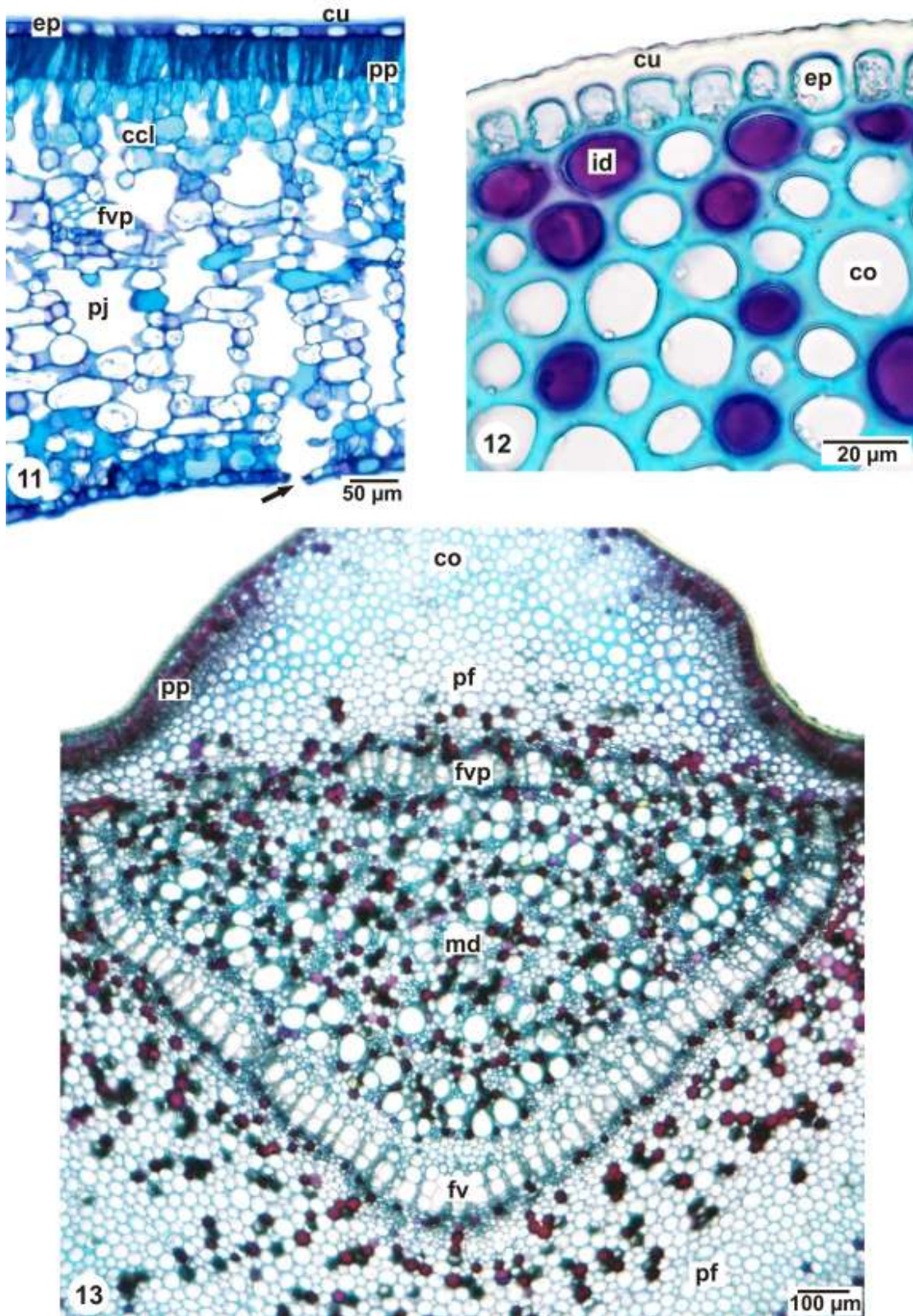
¹⁷ Tecido originado pelo felogênio; é parte da periderme.

Há uma bainha esclerenquimática contínua, formada de vários estratos de fibras em estágio inicial de lignificação, de paredes evidentemente espessadas e lúmen reduzido, envolvendo o sistema vascular (Figuras 25, 28 e 30). O floema externo constitui-se de elementos crivados e células parenquimáticas, formando uma faixa contínua e estreita junto ao xilema (Figuras 25 e 28). Observando-se o lenho, o xilema é totalmente lignificado, formado de elementos traqueais dispostos em fileiras e, entre eles, numerosas fibras, separados por raios estreitos (Figuras 25, 28, 31 e 32). O floema interno dispõe-se em cordões lado a lado, de composição semelhante ao floema externo. A medula consiste de células parenquimáticas, de paredes delgadas (Figuras 25 e 31). Numerosos laticíferos com conteúdo lipofílico e idioblastos fenólicos (Figuras 28, 29 e 31) ocorrem no córtex, no floema e na medula.

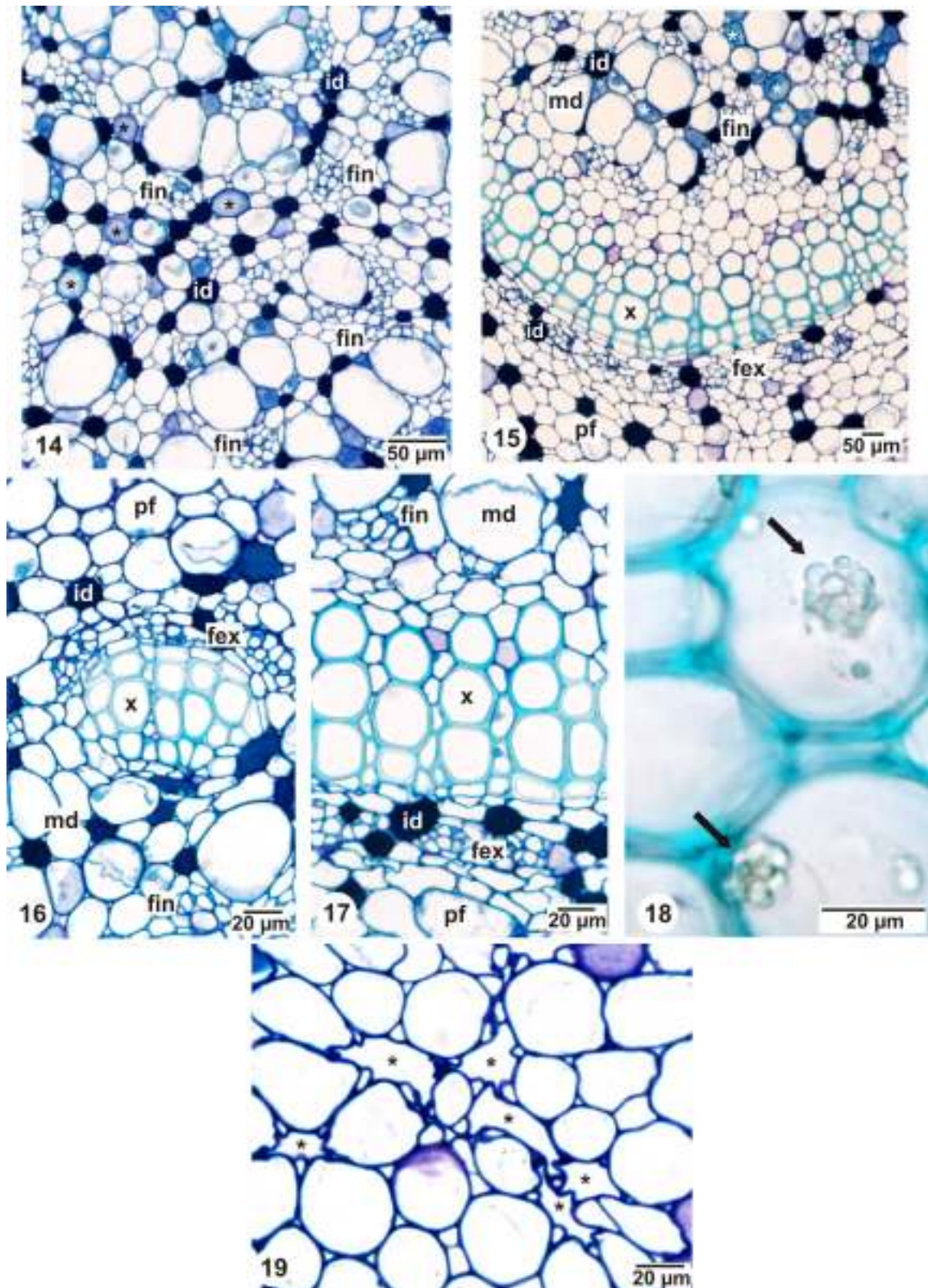
A droga vegetal é definida como as cascas dessecadas de *H. lancifolius* (Figura 6). Os principais caracteres microscópicos que caracterizam esta droga, em crescimento secundário, são várias camadas de súber, consistindo de células tabulares, e parênquima cortical, e em seguida grupos de células pétreas e fibras, totalmente lignificadas, na forma de uma bainha esclerenquimática, além do floema externo, composto por elementos crivados e células parenquimáticas. Laticíferos são observados no córtex da casca caulinar (Figura 33).



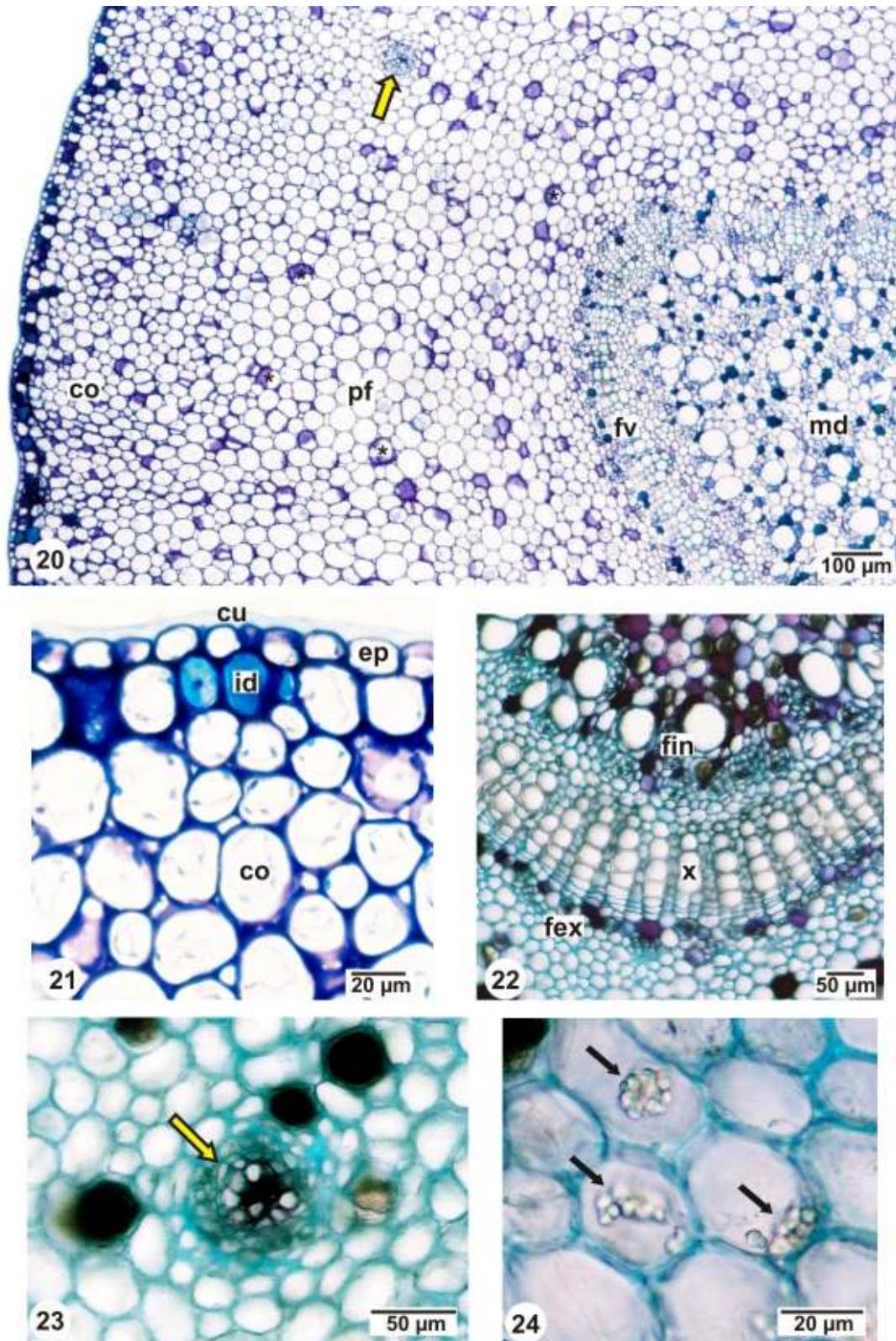
Figuras 4-10. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson – morfologia externa e vista frontal da lâmina foliar: **4.** Aspecto morfológico de ramo florífero; **5.** Aspecto das folhas, mostrando faces adaxial e abaxial; **6.** Fragmentos de casca caulinar, destacando as faces externa e interna; **7.** Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, mostrando as estriações da cutícula; **8.** Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando contorno levemente ondulado e espessado das células; **9.** Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, mostrando estômatos anisocíticos e contorno ondulado das células epidérmicas; **10.** Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, destacando a borda periestomática (seta) dos estômatos. Abreviaturas: abaxial (ab), adaxial (ad), estômato (es), face externa (fext), face interna (fint).



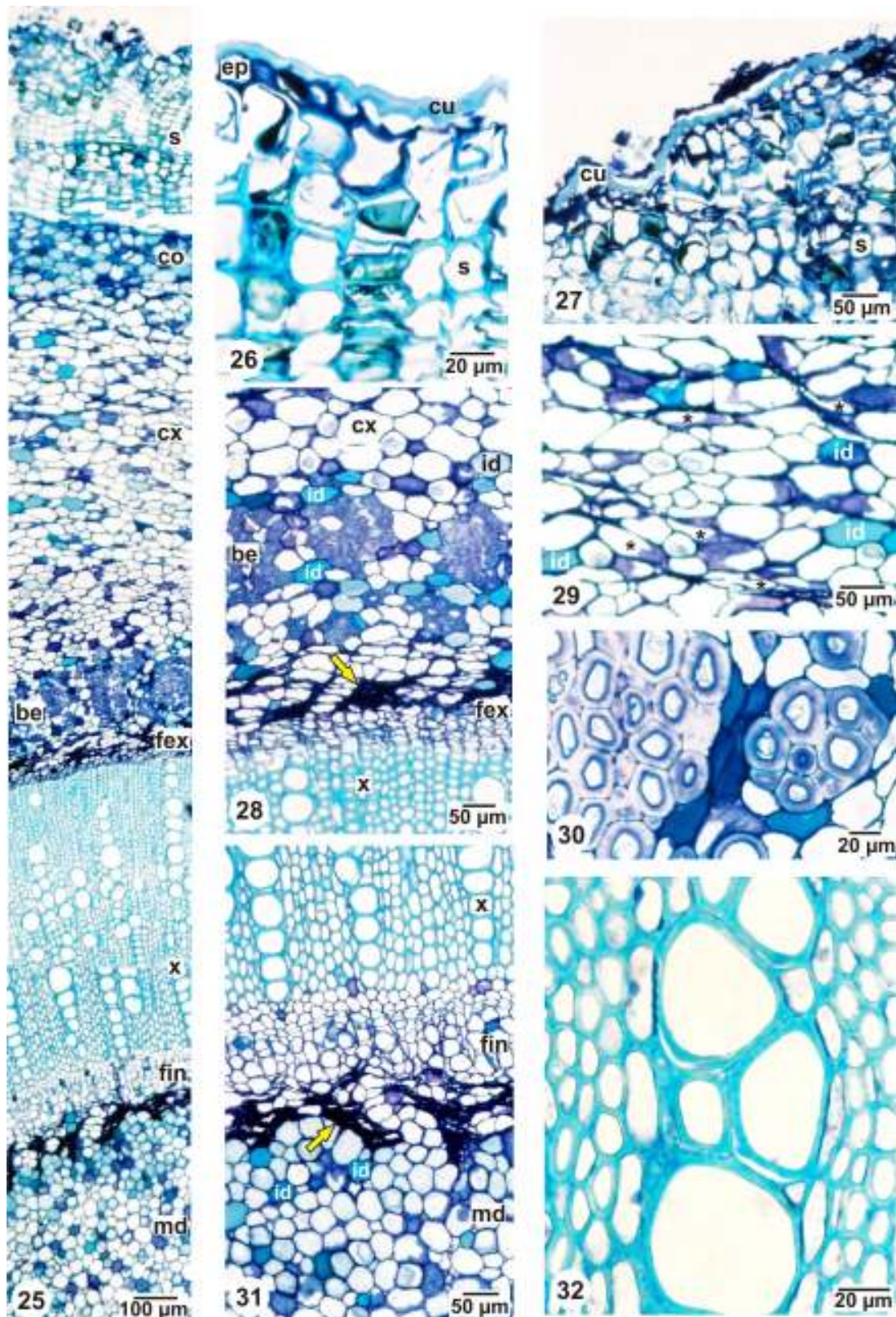
Figuras 11-13. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson – folha, em secção transversal: **11.** Mesófilo dorsiventral (seta= estômato); **12.** Pormenor da epiderme e do colênquima, junto à superfície adaxial da nervura central; **13.** Panorama geral da nervura central. Abreviaturas: células coletoras (ccl), colênquima (co), cutícula (cu), epiderme (ep), feixe vascular de grande porte (fv), feixe vascular de pequeno porte (fvp), idioblastos (id), região medular (md), parênquima esponjoso (pj), parênquima fundamental (pf), parênquima paliçádico (pp).



Figuras 14-19. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson – nervura central, em secção transversal: **14.** Região medular; **15.** Feixe vascular bicolateral de grande porte na nervura central; **16.** Detalhe do feixe vascular bicolateral de pequeno porte na nervura central; **17.** Detalhe do feixe vascular bicolateral de grande porte na nervura central; **18.** Amiloplastos (setas) da bainha amilífera; **19.** Laticíferos em secção transversal. Abreviaturas: floema externo (fex), floema interno (fin), idioblastos (id), laticíferos (asterisco), região medular (md), parênquima fundamental (pf), xilema (x).



Figuras 20-24. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson – pecíolo, em secção transversal: **20.** Panorama geral do pecíolo (seta= feixe anficrival); **21.** Pormenor da epiderme e do colênquima do pecíolo; **22.** Detalhe do feixe vascular bicolorateral de grande porte no pecíolo; **23.** Pormenor do feixe acessório do tipo anficrival (seta) no pecíolo; **24.** Amiloplastos (setas) no parênquima fundamental do pecíolo. Abreviaturas: colênquima (co), cutícula (cu), epiderme (ep), feixe vascular (fv), floema externo (fex), floema interno (fin), idioblastos (id), laticíferos (asteriscos), região medular (md), parênquima fundamental (pf), xilema (x).



Figuras 25-32. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson – caule jovem, em secção transversal: **25.** Organização caulinar geral; **26 e 27.** Detalhe do sistema de revestimento; **28.** Detalhe do córtex, do floema externo e do xilema (seta= laticíferos); **29.** Pormenor da região cortical (asteriscos= laticíferos); **30.** Pormenor da bainha esclerenquimática; **31.** Detalhe do xilema, do floema interno e da medula (seta= laticíferos); **32.** Pormenor do xilema. Abreviaturas: bainha esclerenquimática (be), colênquima (co), córtex (cx), cutícula (cu), epiderme (ep), floema externo (fex), floema interno (fin), idioblastos (id), medula (md), súber (s), xilema (x).

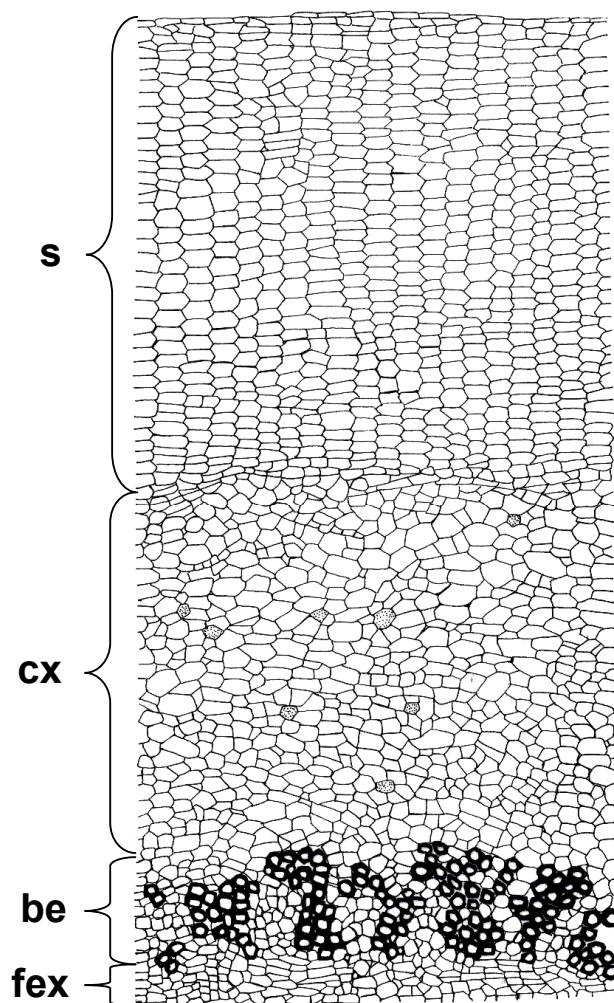


Figura 33. Esquema da casca caulinar de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson. Abreviações: bainha esclerenquimática (be), córtex (cx), floema externo (fex), laticíferos (células hachuradas no córtex) e súber (s).

4.1.1.2. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg.

4.1.1.2.1. Morfologia externa

As folhas (Figuras 34, 35 e 37) são simples, com lâminas inteiras, longo-pecioladas, glabras em ambas as faces, de textura membranácea. A forma da lâmina é lanceolada a levemente obovada, com ápice agudo a acuminado, base aguda a atenuada, margem inteira a ondulada, com pecíolo achatado na face adaxial. A nervação é pinada, camptódroma do tipo broquidódromo, com nervura primária proeminente na face abaxial. As nervuras secundárias são imersas e pouco evidentes na superfície adaxial, com reticulação evidente na face abaxial, verde a amareladas, curvas em direção à margem. As folhas são verticiladas, em número de 4-5 por nó. Observa-se anisofilia em um mesmo verticilo em graus variados, com folhas grandes e pequenas em um mesmo nó, verde-escuras na face adaxial e verde-claras na face abaxial. Quando seccionados transversalmente, a folha e o pecíolo exsudam um látex esbranquiçado.

Os ramos são angulosos, os jovens são castanho-escuros e os mais velhos castanho-claros. Os fragmentos da casca do caule (Figura 36) têm formato plano, com superfície irregular, exibindo gretas ou fendas mais ou menos profundas na face externa, e superfície rugosa na face interna.

4.1.1.2.2. Anatomia da folha

No limbo, em vista frontal, as células da epiderme são revestidas de cutícula levemente estriada e apresentam contorno poligonal na face adaxial (Figura 39), enquanto que na face abaxial são ondeadas (Figura 40). Os estômatos do tipo paracítico¹⁸ (Figura 40) estão inseridos no mesmo nível das demais células epidérmicas, exclusivamente na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática.

Em secção transversal, a epiderme é uniestratificada, com células de tamanhos irregulares, alongadas no sentido periclinal¹⁹. O mesofilo é dorsiventral, composto de parênquima paliçádico, com uma única camada de células,

¹⁸ Presença de uma ou mais células subsidiárias, geralmente duas, paralelas às células-guarda.

¹⁹ Sentido paralelo à superfície.

relativamente mais alongadas e estreitas, e de parênquima esponjoso, formado de várias camadas, correspondendo a 60-70% da altura do mesofilo, com espaços intercelulares evidentes. Há algumas células coletoras, ligando o parênquima esponjoso a outras duas ou mais células do parênquima paliçádico. No mesofilo distribuem-se feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral e de médio porte do tipo biclateral (Figuras 38 e 41).

Em secção transversal, a nervura central apresenta contorno biconvexo, em ângulo agudo na face adaxial (Figura 42). A epiderme é uniestratificada, revestida por cutícula estriada e moderadamente espessada. Seguem-se a ambas as faces, 5-6 camadas de células colenquimáticas com espessamento angular (Figuras 43-45). O parênquima paliçádico interrompe-se gradualmente e observa-se o colênquima e o parênquima fundamental (Figuras 42 e 44). No parênquima fundamental existe um feixe vascular de grande porte do tipo biclateral em formato de arco aberto (Figura 42). O xilema constitui-se de elementos traqueais e células parenquimáticas dispostos em fileiras. O floema externo é constituído de uma faixa contínua de elementos crivados e células parenquimáticas, enquanto que o floema interno é disposto em pequenos grupos formando cordões (Figuras 48 e 49).

O pecíolo (Figura 51), seccionado transversalmente, tem formato plano-convexo. O sistema de revestimento é semelhante à nervura central. Em seguida, observam-se 3-4 camadas de células colenquimáticas com leve espessamento (Figura 52). O xilema e o floema dispõem-se de modo semelhante à nervura central (Figura 53). Lateralmente, em cada lado próximo à face adaxial, observam-se dois feixes acessórios do tipo anficrival, sendo um maior e outro menor (Figura 54).

Laticíferos são encontrados no mesofilo, no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo, e no floema (Figuras 38, 41, 44-46, 50 e 51). Células contendo amiloplastos (Figuras 50 e 55) e drusas de oxalato de cálcio (Figuras 47 e 55) estão presentes no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo.

4.1.1.2.3. Anatomia do caule e casca caulinar

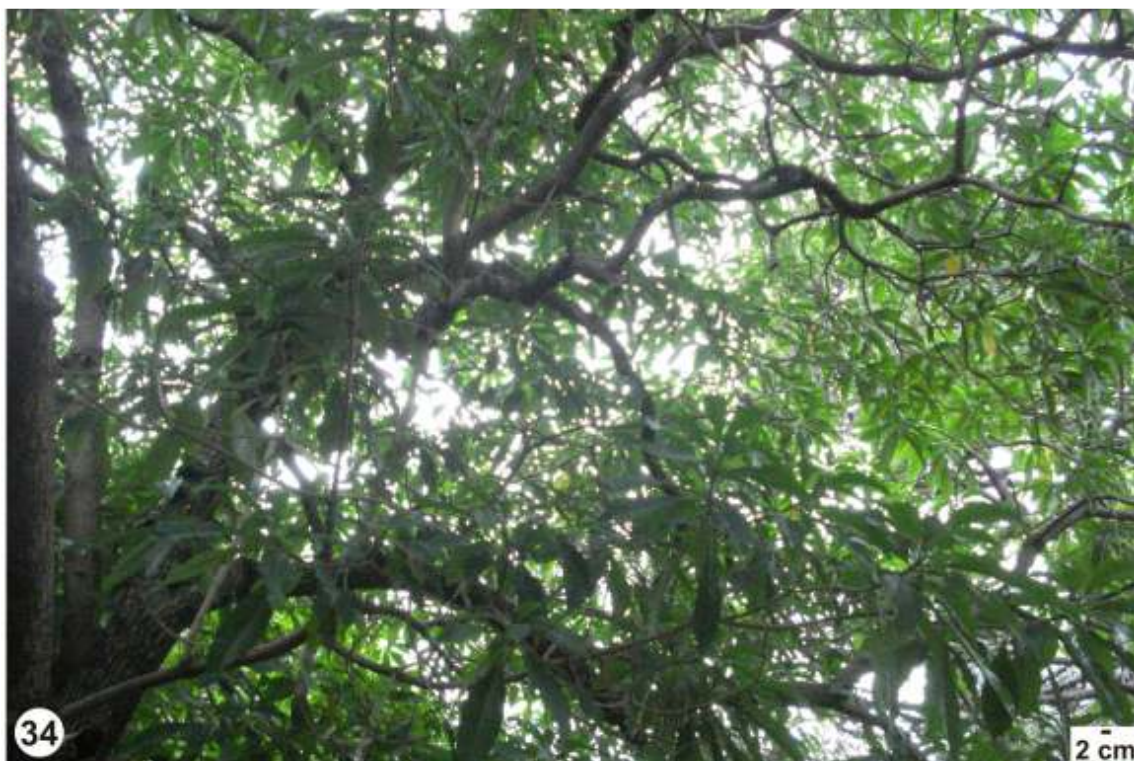
No caule (Figuras 56 e 57), no nível analisado, a epiderme permanece na casca, em fase de destacamento. Em secção transversal, esta é constituída de uma camada de células, revestida por cutícula pouco espessada. As células da epiderme são alongadas em sentido periclinal (Figura 58). Em decorrência do aumento da circunferência do caule, o felogênio instala-se nas camadas corticais. Este forma o

súber em direção à periferia, que consiste de numerosos estratos de células, com paredes suberizadas. Ao felogênio, seguem-se a feloderme e uma região colenquimática com 3-4 camadas de células. No córtex, ocorrem células de paredes delgadas, de formatos e tamanhos irregulares, e numerosos laticíferos e algumas fibras (Figura 59).

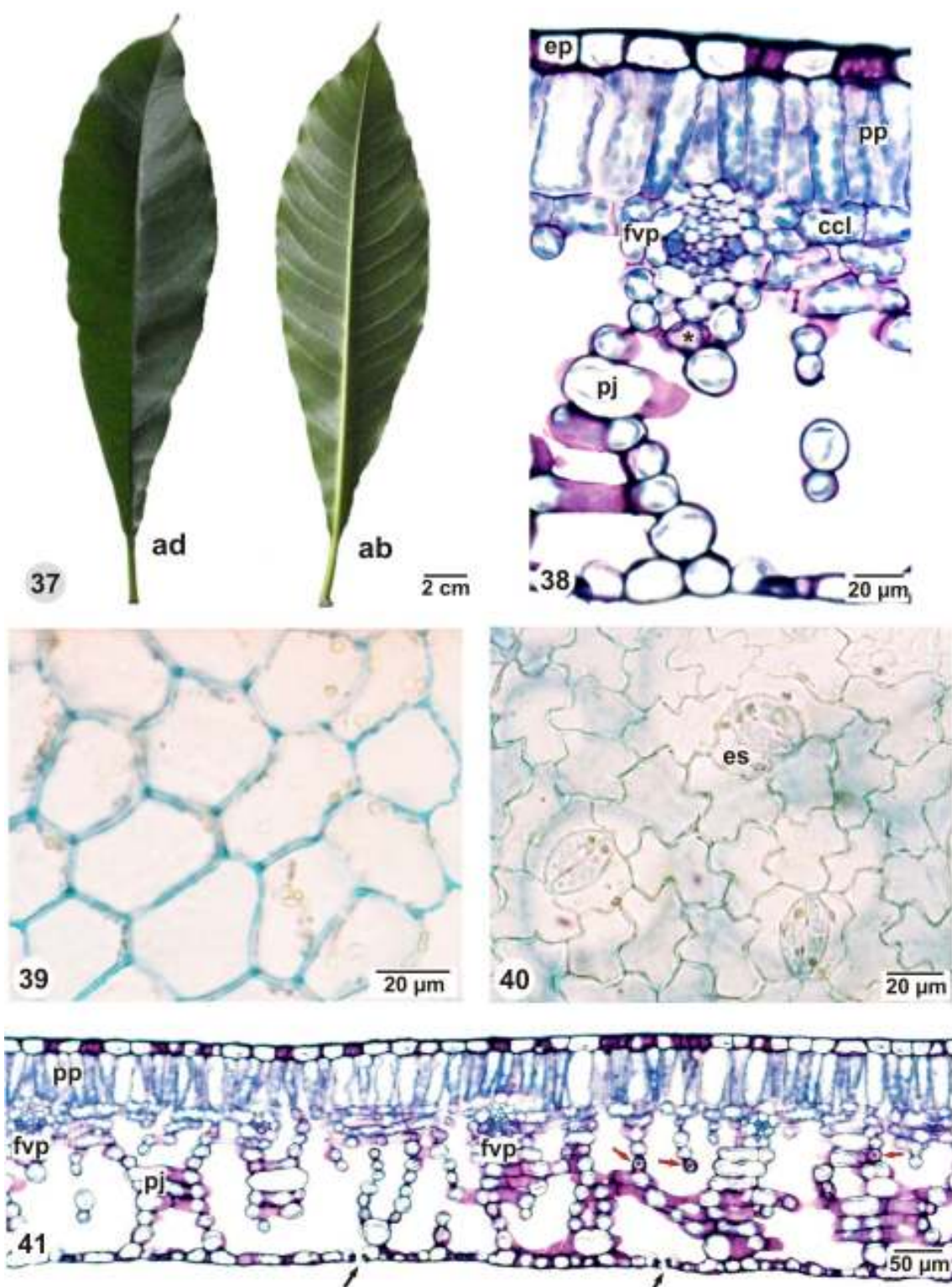
Há uma bainha esclerenquimática incompleta, formada de vários grupos de fibras e células pétreas em estágio inicial de lignificação, de paredes evidentemente espessadas, envolvendo o sistema vascular (Figuras 56, 60 e 61). O floema externo constitui-se de elementos crivados e células parenquimáticas, formando um cilindro contínuo ao redor do xilema, sendo percorrido por raios parenquimáticos estreitos (Figuras 56 e 60). Observando-se o lenho, o xilema é totalmente lignificado, formado de elementos traqueais dispostos em fileiras e, entre eles, numerosas fibras e células parenquimáticas, separados por raios parenquimáticos estreitos (Figuras 56, 57, 60, 63 e 64). O floema interno forma cordões lado a lado de elementos crivados e células parenquimáticas (Figuras 57 e 63). A medula consiste de células parenquimáticas, de paredes delgadas (Figuras 57, 63 e 65).

Numerosos laticíferos ocorrem também no floema e na medula (Figuras 59 e 65). Várias drusas e prismas de oxalato de cálcio são encontrados na medula (Figuras 62 e 63). Idioblastos contendo compostos fenólicos são observados no córtex, no floema e na medula (Figuras 59, 63 e 65). Numerosos amiloplastos são encontrados nas células parenquimáticas do xilema.

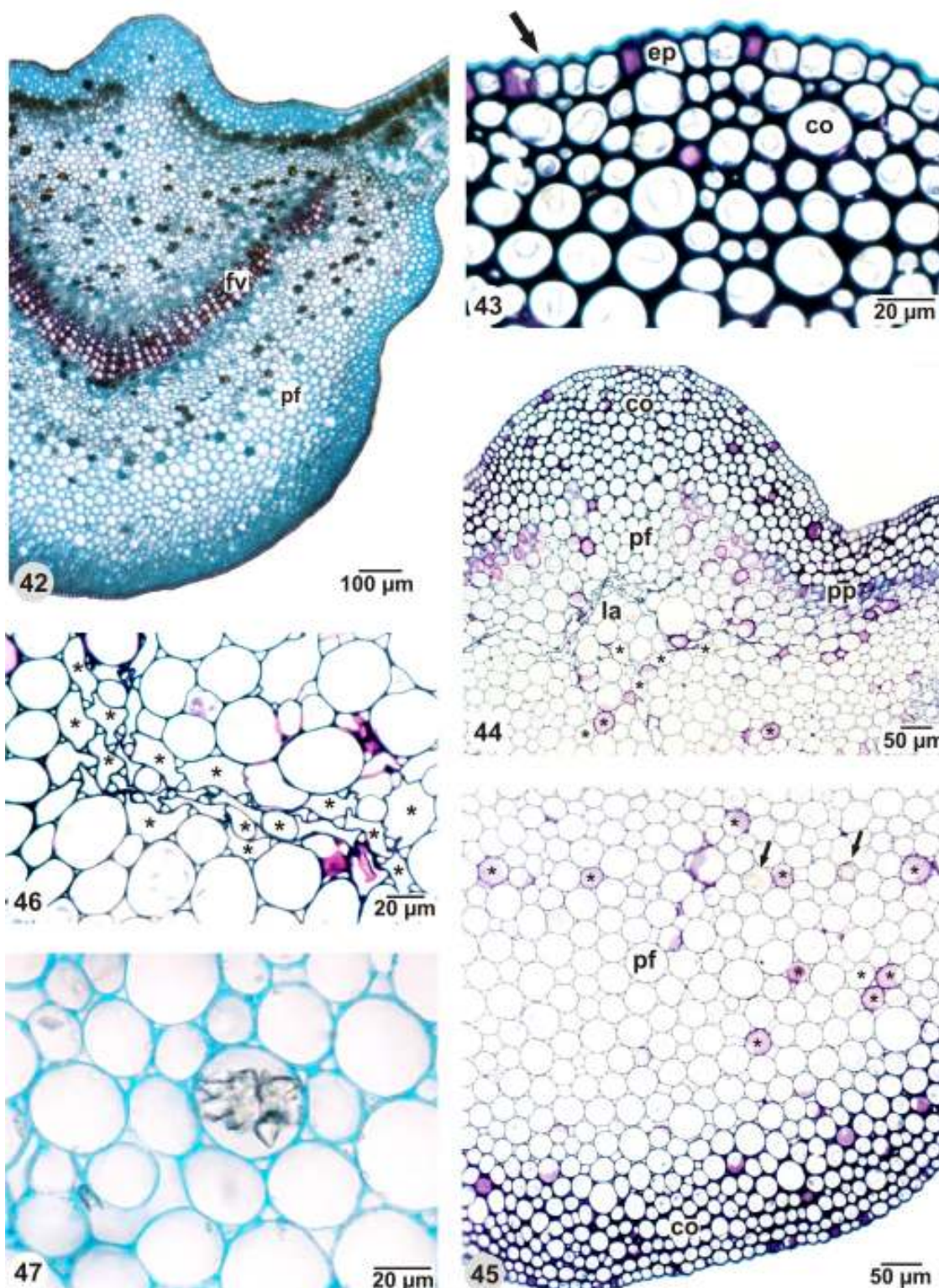
A droga vegetal é definida como sendo as cascas dessecadas de *R. sellowii* (Figura 36). Os principais caracteres microscópicos que caracterizam essa droga, os quais são semelhantes à casca proveniente do vegetal fresco, compreendem várias camadas de súber compostas por células mais achatadas, várias camadas de parênquima cortical de células com tamanhos e formas irregulares, e em seguida, uma bainha esclerenquimática formada por numerosas células pétreas e fibras totalmente lignificadas, além de floema externo. Laticíferos são observados na camada cortical da casca (Figura 66).



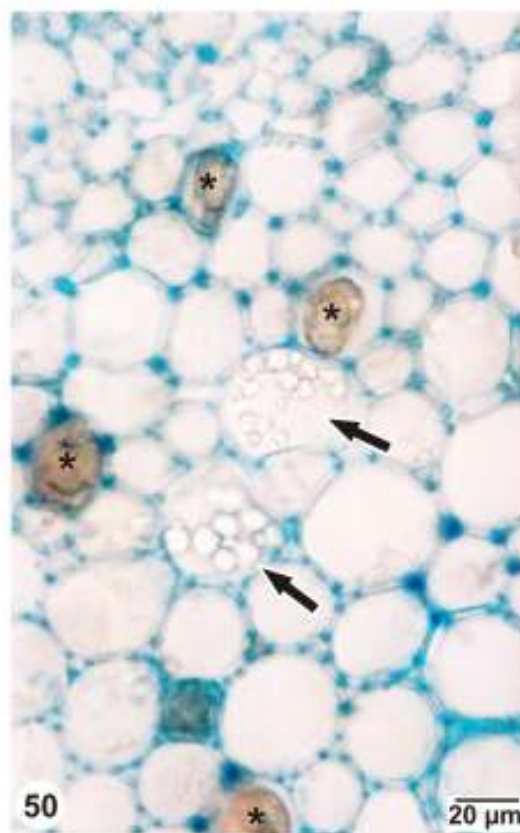
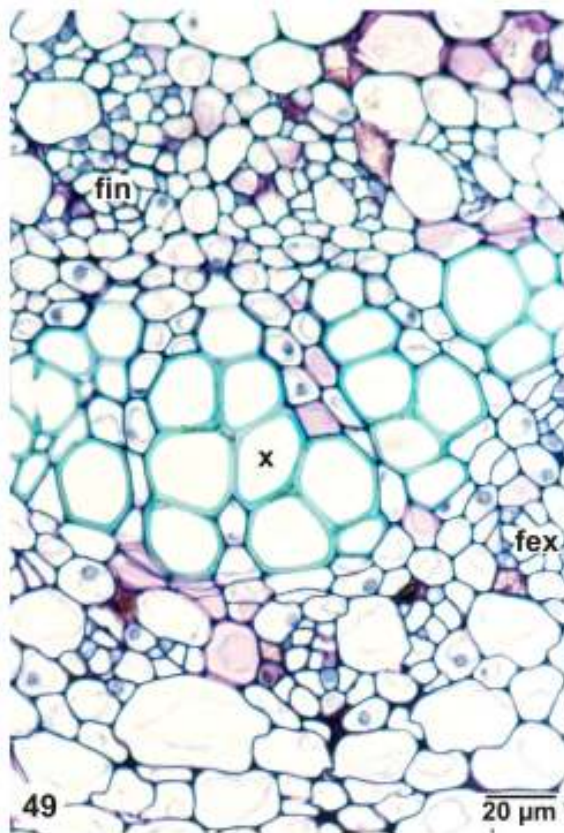
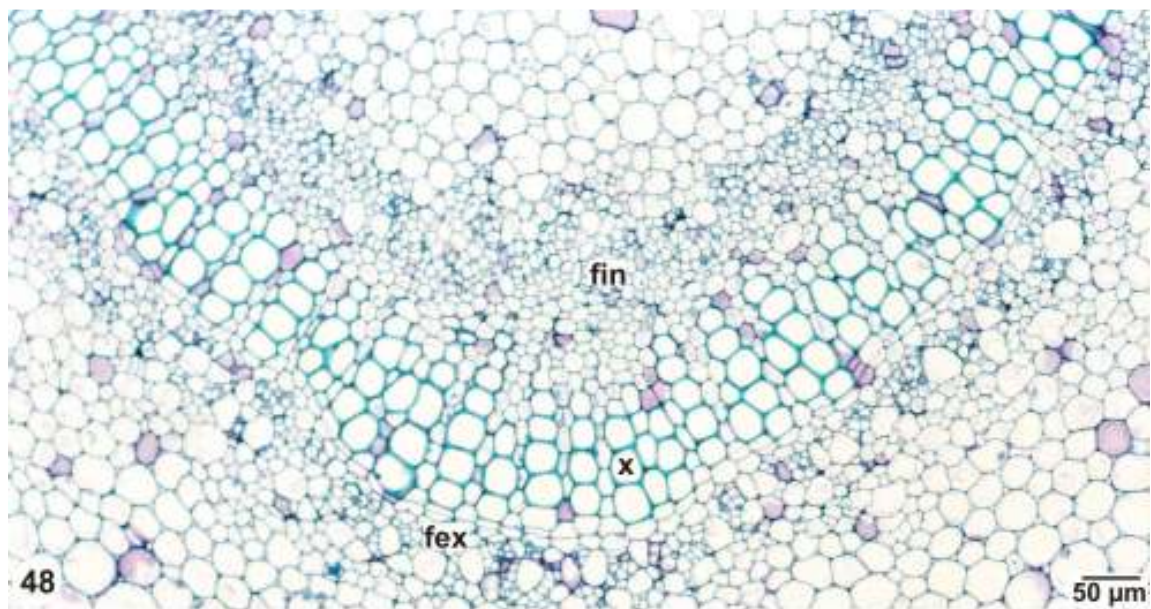
Figuras 34-36. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – morfologia externa. **34.** Aspecto da árvore no hábito; **35.** Ramo vegetativo, mostrando aspecto das folhas; **36.** Fragmentos da casca do caule, destacando as faces externa (fext) e interna (fint).



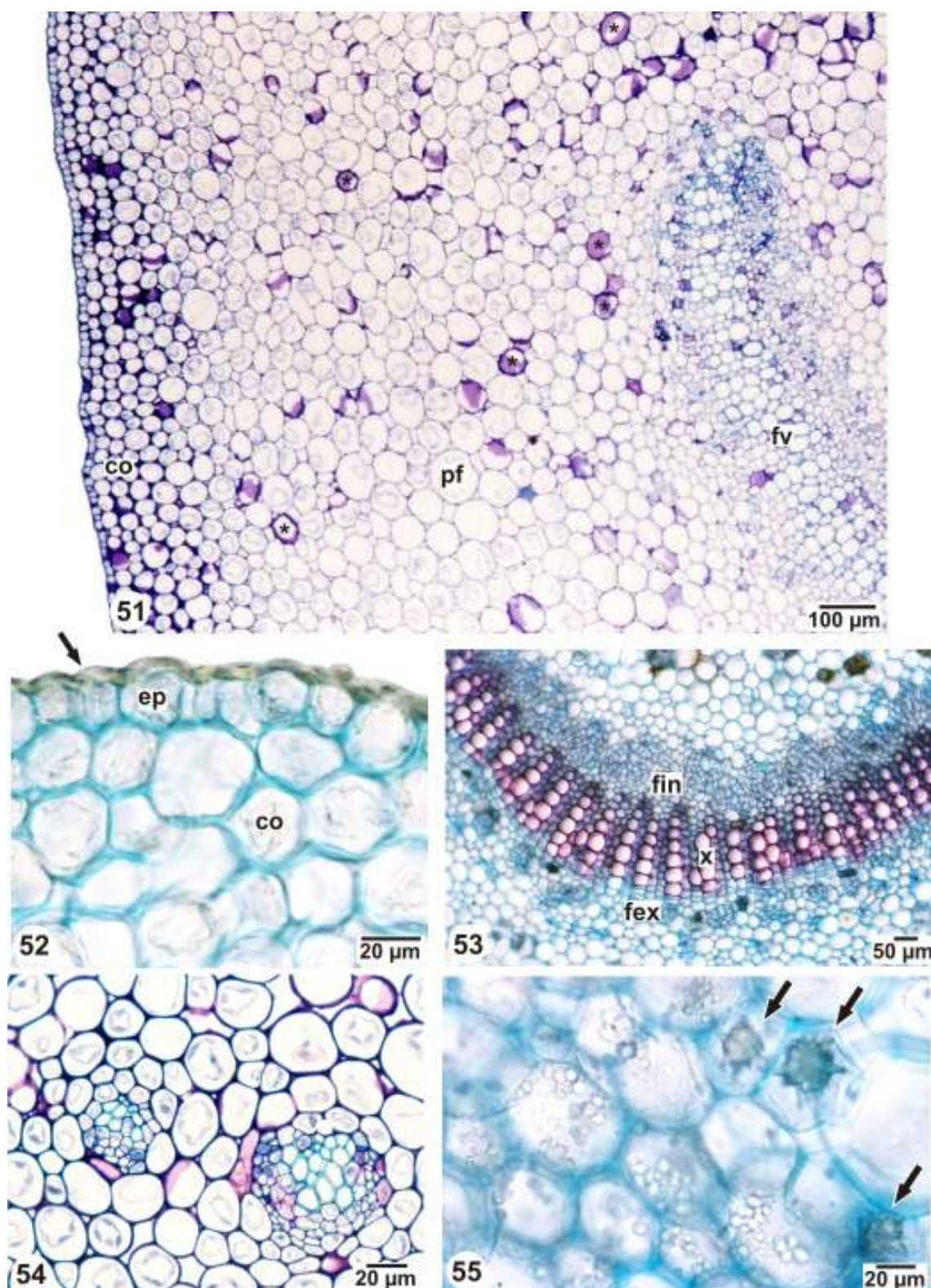
Figuras 37-41. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – folha. **37.** Aspecto das folhas, mostrando faces adaxial e abaxial; **38.** Detalhe do mesofilo dorsiventral; **39.** Vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando contorno poligonal das células; **40.** Vista frontal da epiderme foliar, face abaxial, mostrando estômatos paracíticos e contorno ondulado das células epidérmicas; **41.** Panorama geral do mesofilo dorsiventral (setas pretas= estômatos). Abreviaturas: abaxial (ab), adaxial (ad), célula coletora (ccl), epiderme (ep), estômato (es), feixe vascular de pequeno porte (fvp), laticíferos (asteriscos, setas vermelhas), parênquima esponjoso (pj), parênquima paliçádico (pp).



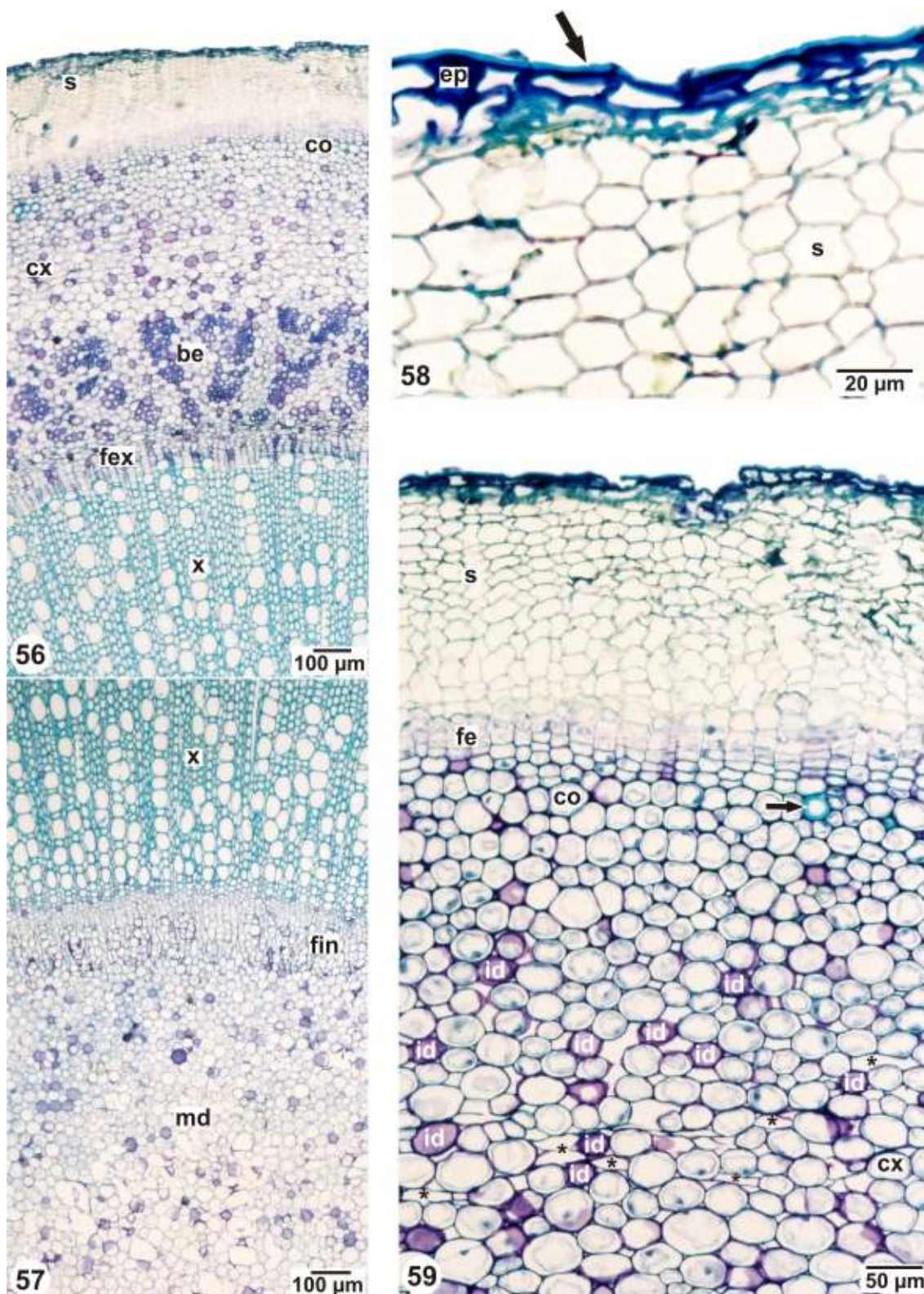
Figuras 42-47. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – nervura central, em secção transversal. **42.** Nervura central mostrando contorno biconvexo, evidenciando o feixe vascular biclateral e o parênquima fundamental; **43.** Pormenor da epiderme e do colênquima junto à superfície adaxial da nervura central (seta= cutícula); **44.** Detalhe da face adaxial da nervura central; **45.** Detalhe da face abaxial da nervura central (setas= drusas de oxalato de cálcio); **46.** Laticíferos distribuídos no parênquima fundamental da nervura central, junto à face adaxial; **47.** Drusa de oxalato de cálcio encontrada no parênquima fundamental da nervura central, junto a face abaxial. Abreviaturas: epiderme (ep), feixe vascular (fv), laticíferos (la, asteriscos), parênquima fundamental (pf), parênquima paliçádico (pp).



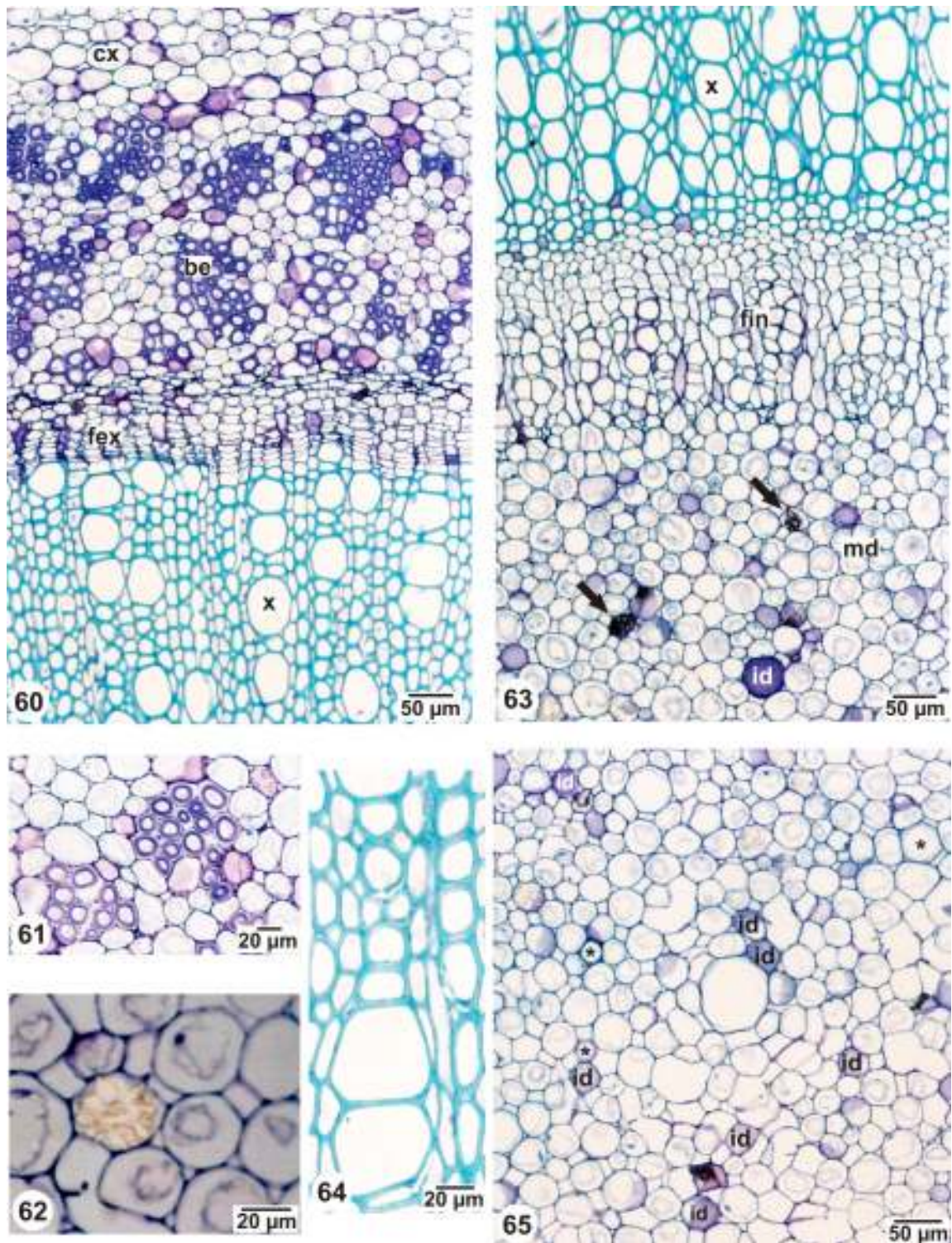
Figuras 48-50. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – nervura central, em secção transversal. **48.** Feixe vascular bicolateral da nervura central; **49.** Detalhe do feixe vascular bicolateral da nervura central, evidenciando o floema externo em faixa contínua e o floema interno agrupado em cordões junto ao xilema; **50.** Amiloplastos e laticíferos encontrados nas proximidades do floema externo, na nervura central. Abreviaturas: amiloplastos (setas), floema externo (fex), floema interno (fin), laticíferos (asteriscos), xilema (x).



Figuras 51-55. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – pecíolo, em secção transversal. **51.** Panorama geral do pecíolo; **52.** Pormenor da epiderme e do colênquima do pecíolo (seta= cutícula); **53.** Detalhe do feixe vascular bicolorateral no pecíolo; **54.** Pormenor dos feixes acessórios do tipo anficrival no pecíolo; **55.** Amiloplastos e drusas de oxalato de cálcio (setas) no parênquima fundamental do pecíolo. Abreviaturas: colênquima (co), epiderme (ep), feixe vascular (fv), floema externo (fex), floema interno (fin), laticíferos (asteriscos), parênquima fundamental (pf), xilema (x).



Figuras 56-59. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – caule jovem, em secção transversal. **56** e **57.** Organização geral do caule jovem; **58.** Pormenor do sistema de revestimento (seta= cutícula); **59.** Detalhe da região da casca no caule (seta= fibra). Abreviaturas: bainha esclerenquimática (be), colênquima (co), córtex (cx), epiderme (ep), felogênio (fe), floema externo (fex), floema interno (fin), idioblastos (id), laticíferos (asteriscos), medula (md), súber (s), xilema (x).



Figuras 60-65. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. – caule jovem, em secção transversal. **60.** Detalhe do caule; **61.** Pormenor da bainha esclerenquimática incompleta; **62.** Drusa de oxalato de cálcio encontrada na região medular; **63.** Detalhe do lenho e da medula (setas= drusas de oxalato de cálcio); **64.** Pormenor do xilema; **65.** Detalhe da região medular. Abreviaturas: bainha esclerenquimática (be), córtex (cx), floema externo (fex), floema interno (fin), idioblastos (id), laticíferos (asteriscos), medula (md), xilema (x).

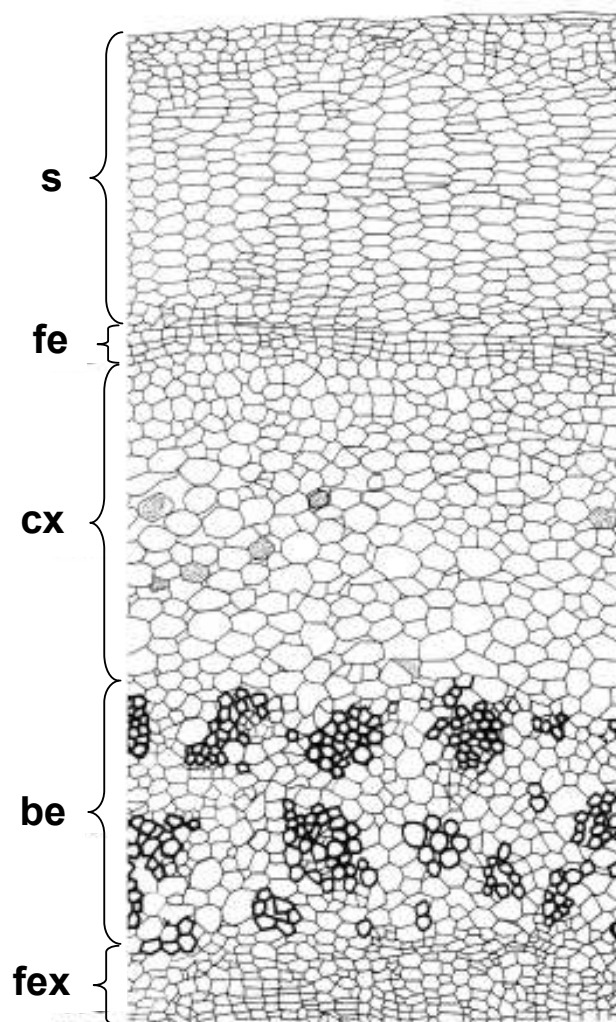


Figura 66. Esquema da casca caular de *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. Abreviaturas: bainha esclerenquimática (be), córtex (cx), felogênio (fe), floema externo (fex), laticíferos (células hachuradas no córtex), súber (s).

4.1.2. Discussão

4.1.2.1. Folha

A morfologia externa das espécies da família Apocynaceae, de um modo geral, é caracterizada por folhas simples e inteiras, geralmente opostas e às vezes verticiladas, raramente alternas, latescentes (Cronquist, 1981; Koch, 1994; Joly, 1998).

A morfologia foliar externa de *R. sellowii* assemelha-se ao descrito por Simões (2000), com nervação das folhas do tipo broquidódromo. A morfoanatomia das folhas de *H. lancifolius* já foi descrita anteriormente por Barros (1986/88). No

entanto, algumas diferenças na descrição realizada por aquele autor foram observadas neste estudo, as quais foram descritas e discutidas. A morfologia foliar externa de *H. lancifolius* assemelha-se ao descrito para o gênero, conforme relatado por Koch (1994), e também para a espécie, conforme estabelecido por Plumel (1991). O formato obovado-lanceolado da lâmina foliar de *H. lancifolius* assemelha-se ao descrito para a maioria das espécies do gênero (Koch, 1994). No entanto, segundo Ferreira e colaboradores (2009), a forma da lâmina foliar pode variar consideravelmente entre as espécies de *Himatanthus*, apresentando-se elíptica ou espatulada em *H. succuba*, oblonga-elíptica em *H. bracteatus*, e lanceolada em *H. stenophyllus* Plumel, por exemplo. Além da forma da lâmina, o ângulo de divergência das nervuras secundárias exibe padrões característicos para cada espécie. Enquanto as nervuras secundárias de *H. lancifolius* têm ângulo praticamente reto, as de *H. succuba* possuem ângulo agudo, arqueadas e unidas para formar uma nervura submarginal a 2-3 mm da margem; as de *H. bracteatus* apresentam ângulo moderadamente agudo e são retas ou apenas levemente arqueadas; e as de *H. stenophyllus* possuem ângulo quase reto e são unidas em uma nervura submarginal próximo a margem.

A epiderme é o tecido mais externo dos órgãos vegetais em estrutura primária e sua principal função é a de revestimento, impedindo choques mecânicos e a invasão de agentes patogênicos, além de evitar a perda excessiva de água. A epiderme tem origem num tecido meristemático chamado de protoderme, formando geralmente uma única camada de células. A maioria das células epidérmicas possui formato tabular, com o sentido periclinal maior que o anticlinal. Comumente, em vista frontal, as células da epiderme são poligonais ou irregulares, perfeitamente justapostas, com paredes retas, curvas ou sinuosas (Alquini et al., 2006). De acordo com Metcalfe (1988), as células epidérmicas variam consideravelmente em tamanho, forma e orientação nas folhas simples.

Nas espécies estudadas, a epiderme apresentou-se uniestratificada em ambas as faces. Em vista frontal, observa-se em *H. lancifolius* células de formato ondulado, de maneira mais acentuada na face abaxial, assemelhando-se ao descrito por Barros (1986/88) para esta espécie, assim com também verificado em *H. succuba* (Larrosa; Duarte, 2005), enquanto que em *H. obovatus* as células da epiderme superior possuem paredes retilíneas (Carmo et al., 2005). As células epidérmicas de *R. sellowii* apresentam-se poligonais na face adaxial, com aproximadamente 5-6 lados, a maioria de paredes retas, e evidentemente ondeada

na face abaxial, de modo semelhante à *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e *R. schuelii* Speg. (Debes et al., 2008). Segundo Alquini e colaboradores (2006), as paredes sinuosas das células epidérmicas são mais frequentes na face abaxial. O fato das paredes serem onduladas deve-se, provavelmente, às tensões ocorridas na folha durante a diferenciação das células ou ao endurecimento da cutícula.

A cutícula, uma camada de substâncias graxas composta majoritariamente por cutina, é principalmente responsável pela impermeabilização das células epidérmicas, proteção contra radiação solar excessiva e barreira contra micro-organismos, e pode apresentar uma série de estriações que possuem grande valor taxonômico (Mauseth, 1988; Alquini et al., 2006).

A epiderme das espécies estudadas é revestida de cutícula, evidentemente estriada, assim como observado em outras espécies da família, como *P. rubra* forma *acutifolia* (Poir.) Woodson (Barreto et al., 2001), *P. rubra* var. *alba* L. (Araújo et al., 1984), *Mandevilla coccinea* (Hook. & Arn.) Woodson, *Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. (Larrosa, 2004), *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e *R. schuelii* (Debes et al., 2008). No caso de *H. lancifolius*, a cutícula é pronunciadamente mais espessa na face adaxial, também verificado em *H. succuba* (Larrosa; Duarte, 2005) e *H. obovatus* (Carmo et al., 2005), enquanto que em *R. sellowii*, a cutícula é pouco espessa em ambas as faces. A espessura da cutícula é variável e influenciada pelas condições ambientais (Esau, 1974), como intensidade da luz e disponibilidade de água (Cutter, 1986). As plantas de regiões áridas e ensolaradas frequentemente possuem folhas bastante cutinizadas, e dependendo do grau de aridez do ambiente, a espessura da cutícula aumenta proporcionalmente. Da mesma forma, em ambientes úmidos e sombrios, a cutícula geralmente é fina (Wilkinson, 1988).

Os estômatos estão relacionados com trocas gasosas no interior dos órgãos onde estão localizados e são frequentemente encontrados nas partes fotossintetizantes, principalmente na lâmina foliar, tanto que as células estomáticas geralmente são as únicas da epiderme que sempre contêm cloroplastos. Eles podem ser encontrados exclusivamente na face adaxial ou na face abaxial, ou em ambas. Estas estruturas são constituídas por células-guarda, de formato reniforme característico, e uma fenda, chamada de ostíolo. Os estômatos podem desenvolver-se entre as células comuns da epiderme ou entre células subsidiárias, cujo número e disposição são variáveis. São denominadas células subsidiárias somente aquelas que circundam o estômato e que são claramente diferentes das demais células

epidérmicas, e são justamente estas células a base para a classificação dos vários tipos de estômatos (Alquini et al., 2006).

Os estômatos de Apocynaceae são predominantemente do tipo anomocítico²⁰ ou paracítico, e algumas vezes uma mistura de ambos ocorrem na mesma folha (Metcalfe; Chalk, 1950). Em menor proporção, podem ser encontrados estômatos do tipo anisocítico, ciclocítico, paralelocítico (Metcalfe, 1988), e raramente actinocítico (Cronquist, 1981). Nesta família, os estômatos encontram-se basicamente na face abaxial, envoltos por vários anéis ou células subsidiárias dispostas radialmente (Metcalfe; Chalk, 1950).

Em *H. lancifolius*, foram observados apenas estômatos do tipo anisocítico, exclusivamente na face abaxial, da mesma forma que em *H. obovatus* (Carmo et al., 2005). Entretanto, Barros (1986/88) descreveu adicionalmente em *H. lancifolius* a presença de estômatos do tipo paracítico, anisocítico e ciclocítico, apenas na face abaxial. Larrosa & Duarte (2005) constataram em *H. succuba* a presença de apenas estômatos do tipo anomocítico, também exclusivamente na face abaxial. Em *R. sellowii* foram encontrados apenas estômatos do tipo paracítico, exclusivamente abaxial. O mesmo padrão estomático foi verificado em *R. grandiflora*, com predominância de estômatos do tipo paracítico, porém alguns do tipo anomocítico também foram observados (Gonçalves, 1964). Em *R. schuelii*, no entanto, o padrão estomático é bastante variado, apresentando estômatos dos tipos hemiparacítico, paracítico, anisocítico, tetracítico, ciclocítico e actinocítico, com borda periestomática evidente (Debes et al., 2008). Estômatos dos tipos anomocítico, paracítico e anisocítico já foram relatados em *P. rubra* (Araújo et al., 1984; Barreto et al., 2001), *Catharanthus roseus* var. *roseus* (Pacheco, 1980), *Plumeriopsis ahouai* (L.) Rusby & Woodson (Costa; Costa, 1980), *Mandevilla coccinea* e *Forsteronia glabrescens* (Larrosa, 2004), confirmando o padrão estomático característico da família Apocynaceae.

Neste estudo, foi constatada a presença de borda periestomática nos estômatos de *H. lancifolius*, sendo que o mesmo tipo de ornamentação foi observado em *H. succuba* por Larrosa & Duarte (2005). A presença de borda periestomática não foi relatada por Barros (1986/88) para a espécie em questão.

Nas espécies estudadas não foi verificada a presença de tricomas, caracterizando as folhas como glabras em ambas as faces. Segundo Arambarri e

²⁰ Não há distinção entre as células epidérmicas e as células subsidiárias; não há células subsidiárias associadas às células-guarda.

colaboradores (2008), tricomas glandulares são ausentes em *R. sellowii*. Em outras espécies destes dois gêneros, tricomas também não foram descritos na caracterização morfoanatômica das folhas, como é o caso de *H. obovatus* (Carmo et al., 2005), *H. sucuuba* (Larrosa; Duarte, 2005; Ferreira et al., 2009), *H. bracteatus* e *H. stenophyllus* (Ferreira et al., 2009), e *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e *R. schuelii* (Debes et al., 2008).

Na família Apocynaceae, o mesofilo é geralmente dorsiventral (Metcalf; Chalk, 1950), o que foi constatado nas espécies analisadas. No mesofilo dorsiventral, a grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico, especializado na fotossíntese. Um fator importante que aumenta a eficiência fotossintética é a ampliação de um sistema de espaços intercelulares no mesofilo, uma vez que aumenta a capacidade para trocas gasosas (Menezes et al., 2006).

No estudo em questão, o mesofilo de *H. lancifolius* é constituído por pelo menos duas camadas de parênquima paliçádico. Em *H. obovatus* também foram observadas duas camadas de parênquima paliçádico e o parênquima esponjoso apresentou-se espesso com grandes espaços intercelulares (Carmo et al., 2005). Já em *H. sucuuba*, *H. bracteatus* e *H. stenophyllus* o parênquima paliçádico variou entre 1-2 camadas, porém com predominância de duas camadas de células (Ferreira et al., 2009). Contudo, Metcalfe (1988) relata que o número de camadas de células paliçádicas também varia, não apenas entre espécies diferentes, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie. Em ambas as espécies em estudo, observa-se entre os parênquimas paliçádico e esponjoso, uma camada de células coletoras, da mesma forma que foi observado em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e *H. sucuuba* (Larrosa, 2004).

Esau (1974) e Metcalfe (1988) relatam que feixes vasculares de pequeno porte, com paredes finas, dos tipos colateral e bicolateral, esféricos e envoltos por bainha parenquimática são geralmente observados no mesofilo de Angiospermas. Metcalfe & Chalk (1950) relatam que estruturas semelhantes são comumente encontradas em Apocynaceae, o que foi constatado nas espécies analisadas.

A nervura central, principalmente em dicotiledôneas, apresenta uma estrutura anatômica semelhante à do pecíolo, onde são distinguidas a presença de uma epiderme, de um córtex apenas parenquimático ou contendo colênquima e

esclerênquima, e de uma endoderme²¹ envolvendo o sistema vascular (Menezes et al., 2006). Em Apocynaceae, o feixe vascular da nervura central é tipicamente bicolateral (Metcalf; Chalk, 1950), em concordância com o evidenciado nas duas espécies. Ainda de acordo com esses autores, o feixe vascular geralmente está estruturado em forma de arco aberto, o que confere com o verificado em *R. sellowii*, e também em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964), *R. schuelii* (Debes et al., 2008), *P. ahouai* (Costa; Costa, 1980), *P. rubra* (Araújo et al., 1984; Barreto et al., 2001), *C. roseus* (Pacheco, 1980), *M. coccinea* e *F. glabrescens* (Larrosa, 2004). Os feixes vasculares de *H. lancifolius* assumem um arranjo triangular tanto na nervura central como no pecíolo, o qual já foi descrito por Barros (1986/88), Larrosa & Duarte (2005) e Ferreira e colaboradores (2009).

Com relação ao pecíolo, Metcalfe & Chalk (1950) e Howard (1988) descrevem que pequenos feixes acessórios são comumente encontrados no pecíolo. Em *H. lancifolius* é observado um feixe acessório do tipo anficrival, cuja presença não foi relatada por Barros (1986/88), mas identificado também em *H. sucuuba* por Larrosa & Duarte (2005). Em *R. sellowii* são observados dois feixes acessórios do tipo anficrival em cada lado do pecíolo, próximo a região adaxial, os quais estão ausentes em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964). No entanto, Debes e colaboradores (2008) descrevem a existência de dois feixes de menor tamanho do tipo colateral nas costeletas laterais na superfície adaxial do pecíolo de *R. schuelii*.

Com relação à morfologia peciolar, em *Himatanthus* a forma do pecíolo pode ser utilizada como aspecto para diferenciação de espécies: o pecíolo de *H. sucuuba* e *H. stenophyllus* é canaliculado, plano ou quase plano na superfície adaxial, enquanto que o de *H. bracteatus* é cilíndrico, achatado na superfície adaxial e circular-convexo na face abaxial (Ferreira et al., 2009), em comparação com a espécie deste estudo. Da mesma forma em *Rauvolfia*, o pecíolo de *R. sellowii* apresenta formato plano-convexo, enquanto o de *R. schuelii* possui formato subcircular com duas costeletas laterais na superfície adaxial. Diferentemente da espécie deste estudo, o pecíolo de *R. schuelii* possui colênquima com espessamento laminar, angular e lacunar, com 4-5 estratos de células (Debes et al., 2008).

Cronquist (1981) relatou que a grande maioria das espécies situadas na ordem Gentianales possui floema interno, o qual forma um anel contínuo ao redor do

²¹ Camada de tecido fundamental formando uma bainha ao redor da região vascular; em caules e raízes de plantas com sementes, é representada pela camada mais interna do córtex.

xilema ou encontra-se em feixes isolados nas margens da medula. Em Apocynaceae, o floema interno está sempre presente (Metcalf; Chalk, 1950; Cronquist, 1981). Em *H. lancifolius*, o floema interno encontra-se como pequenos grupos em meio às células parenquimáticas da região medular, situado internamente ao arranjo triangular da nervura central, em uma organização semelhante a *H. succuba* (Larrosa, 2004; Ferreira et al., 2009), *H. bracteatus*, *H. stenophyllus* (Ferreira et al., 2009), *H. obovatus* (Carmo et al., 2005) e *P. rubra* (Araújo et al., 1984; Barreto et al., 2001). Em *R. sellowii*, o floema interno está organizado em pequenos grupos formando cordões em torno do feixe vascular em arco aberto, do mesmo modo que em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e *C. roseus* (Pacheco, 1980). O floema externo e o xilema das espécies estudadas estão organizados de modo semelhante ao observado em outras espécies da família (Gonçalves, 1964; Costa; Costa, 1980; Pacheco, 1980; Araújo et al., 1984; Barreto et al., 2001).

Numerosos amiloplastos, a semelhança de uma bainha amilífera, situam-se na região inferior da nervura central de *H. lancifolius* e de *R. sellowii*. O amido de reserva é formado em leucoplastos denominados amiloplastos. Cada amiloplasto pode conter desde um a muitos grãos de amido, constituídos pela deposição de amido em camadas. Os grãos de amido podem ser encontrados em todos os tecidos parenquimáticos, como córtex e medula, e também em tecidos vasculares, mas principalmente em órgãos de armazenamento como tubérculos, rizomas e sementes. O amido é sintetizado pelos cloroplastos e é subsequentemente quebrado e transportado como açúcar às outras partes do vegetal, onde é resintetizado pelos amiloplastos (Esau, 1974; Cutter, 1986; Mauseth, 1988).

Nas células de muitas plantas são encontrados depósitos cristalinos de várias formas. A maioria consiste de sais de cálcio, principalmente oxalato de cálcio e em menor proporção, carbonato de cálcio. Geralmente consideram-se os cristais como depósitos de produtos de excreção, que são sintetizados nos vacúolos, comumente organizados na forma de drusas (Cutter, 1986). Pequenos cristais prismáticos aglomerados na forma de drusas ou solitários e estiloides de oxalato de cálcio são característicos da família Apocynaceae, frequentemente distribuídos nos tecidos parenquimáticos (Metcalf; Chalk, 1950; Cronquist, 1981). Drusas de oxalato de cálcio foram encontradas em *R. sellowii* na região do parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo, da mesma forma que em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964) e em *R. schuelii* (Debes et al., 2008), ao contrário de *R. pentaphylla* Huber ex Ducke, *R. sprucei* e *R. tetraphylla* que não possuem cristais (Ferrucci et al., 2007).

Não foram observados cristais de qualquer natureza em *H. lancifolius* neste estudo, assim como Ferreira e colaboradores (2009) também não observaram cristais de qualquer tipo nem no mesofilo nem na nervura central de *H. sucuuba*, *H. bracteatus* e *H. stenophyllus*.

Foram identificados em *H. lancifolius* idioblastos com conteúdo fenólico, os mesmos verificados em *H. sucuuba* (Larrosa, 2004), que segundo Barros (1986/88) são idioblastos taníferos, ricos em taninos, distribuindo-se no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo, em algumas células epidérmicas, colenquimáticas e paliçádicas. Em *R. sellowii*, a ocorrência de idioblastos fenólicos não foi confirmada, ocorrendo o mesmo em *R. grandiflora* (Gonçalves, 1964). A presença de compostos fenólicos, principalmente taninos, em órgãos totalmente diferenciados está relacionada com os mecanismos de defesa da planta (Castro; Machado, 2006).

Além do floema interno, outra característica anatômica de ocorrência universal nessa família são os laticíferos. Os canais laticíferos geralmente acompanham os feixes vasculares, relacionados principalmente ao floema, e algumas vezes estão presentes no mesofilo, podendo alcançar a epiderme. Provavelmente, os laticíferos podem estar envolvidos em mecanismos de cicatrização vegetal, através da coagulação das partículas do látex. É possível observar traços de látex nos laticíferos de espécies dos gêneros *Himatanthus*, *Plumeria* e *Rauvolfia*, que encerram conteúdo granular amarelo brilhante (Metcalfe; Chalk, 1950; Cutter, 1986).

Nas espécies estudadas, foram encontrados laticíferos no parênquima fundamental da nervura central e do pecíolo, e no mesofilo e no floema da folha, e no córtex, no floema e na medula do caule e da casca. Traços de látex, de coloração amarelada, foram observados no interior de alguns laticíferos de *H. lancifolius* e *R. sellowii*. Em Apocynaceae, os laticíferos geralmente possuem tamanho maior e paredes mais espessas que as células circunvizinhas, núcleo proeminente, citoplasma denso, formato poligonal ou circular em secção transversal, sem grãos de amido em seu interior (Cutter, 1986), de modo similar ao encontrado nas espécies em estudo.

O látex é uma suspensão ou emulsão de pequenas partículas (óleos, resinas, ceras e borracha) dispersas em um líquido que contém mucilagem, carboidratos, ácidos orgânicos, íons minerais e enzimas proteolíticas, com a função de defesa contra micro-organismos e redução da herbivoria (Castro; Machado,

2006). De acordo com Mahlberg (1993), o látex é derivado da seiva bruta, a qual é conduzida até as folhas, onde sofre um processo de “elaboração” e é liberada em ductos lactíferos como látex. Subsequentemente, o látex é distribuído por todo o vegetal, até chegar à casca do caule. Durante este movimento, o látex supostamente permeia todos os tecidos vivos, provendo a eles substâncias nutritivas. Os ductos secretores são constituídos por células bastante alongadas, de formato irregular, e geralmente são delimitados por uma fina membrana que reveste toda a cavidade interna, a qual torna-se mais resistente e espessa em estruturas mais desenvolvidas.

4.1.2.2. Caule e casca caulinar

A estreita associação do caule com as folhas faz com que esta seja a parte do eixo da planta mais complexa (Esau, 1974). A organização interna do caule em estrutura secundária de *H. lancifolius* e *R. sellowii* é semelhante, podendo-se distinguir o sistema de revestimento, a região cortical, o cilindro vascular e a medula. Em Apocynaceae, o felogênio possui origem superficial no caule (Metcalf; Chalk, 1950; Cronquist, 1981; Metcalfe, 1988), como verificado nas espécies analisadas, onde esse meristema se instala nas camadas subepidérmicas e corticais.

A epiderme é a interface inicial entre a planta e seu ambiente, sendo a primeira proteção para o vegetal (Mauseth, 1988). Em órgãos com crescimento secundário, a epiderme é substituída pela periderme (Alquini et al., 2006). A periderme é um tecido protetor que substitui os tecidos externos do caule e da raiz e consiste de felogênio, felema (súber) e feloderme. O felogênio origina externamente o súber e internamente algumas camadas de feloderme. O súber consiste de camadas compactas de células, sem espaços intercelulares, com paredes suberizadas, o que confere propriedades protetoras, enquanto a feloderme consiste de células parenquimáticas ativas, geralmente com 3 a 4 camadas (Cutter, 1986; Mazzoni-Viveiros; Costa, 2006). Nesta família, a periderme consiste tanto de células de paredes finas quanto de paredes esclerificadas e que podem conter cristais (Metcalf; Chalk, 1950). Nas espécies estudadas, a epiderme ainda persiste, porém uma periderme formada abaixo da epiderme, bastante suberificada, é evidenciada.

Cristais de oxalato de cálcio na forma de prismas e drusas, agrupados ou isolados, são comuns em tecidos não lignificados de caules de Apocynaceae (Metcalf; Chalk, 1950), e foram encontrados na região medular do caule de *R. sellowii*, e também observados em *H. succuba*, *F. glabrescens* (Larrosa, 2004) e *P.*

ahouai (Costa; Costa, 1980). No caule de *H. lancifolius* não foi observada a presença de cristais de oxalato de cálcio, porém em *H. stenophyllus* e *H. succuuba* foi verificada grande quantidade de cristais prismáticos de oxalato de cálcio na região da casca. Drusas de oxalato de cálcio não foram identificadas nas espécies estudadas por Ferreira e colaboradores (2009), *H. succuuba*, *H. bracteatus* e *H. stenophyllus*.

Em *R. sellowii* foi notada a presença de numerosos amiloplastos nas células parenquimáticas entre os elementos traqueais do xilema, sendo também verificados no parênquima lenhoso apotraqueal e nos raios medulares de *P. ahouai* (Costa; Costa, 1980).

As fibras são células longas, com paredes secundárias mais ou menos espessas, geralmente em feixes ou cordões, que têm como principal função sustentar as partes do vegetal que não se alongam mais, conferindo rigidez ou flexibilidade às estruturas (Esau, 1974; Costa et al., 2006; Scatena; Scremin-Dias, 2006). As fibras podem estar presentes no xilema ou floema, como uma bainha associada aos feixes vasculares, especialmente nas folhas ou nos tecidos parenquimáticos da medula ou do córtex caulinar (Cutter, 1986). Na família ocorrem fibras não lignificadas, mucilaginosas, conhecidas como fibras celulósicas brancas, isoladas ou dispostas continuamente na forma de anel ou em cordões no periciclo, com paredes concêntricamente delimitadas (Metcalf; Chalk, 1950; Cronquist, 1981). Estas fibras mucilaginosas absorvem muita água e podem intumescer-se, auxiliando nos mecanismos de torção do vegetal (Scatena; Scremin-Dias, 2006).

Nas espécies em estudo, fibras em estágio inicial de lignificação foram observadas na forma de bainha esclerenquimática, envolvendo o sistema vascular. Não se pode afirmar que essa bainha seja pericíclica, uma vez que estudos ontogênicos não foram realizados, já que essas fibras podem ser também de origem floemática. Na região da bainha esclerenquimática de *H. lancifolius* e *R. sellowii* nota-se a presença de células pétreas de paredes espessadas. Em *R. sellowii* também foi notada a presença de fibras não lignificadas no córtex, escassamente dispersas.

Da mesma forma que em folhas, o sistema vascular é tipicamente bicolateral em caules de Apocynaceae e o floema interno dispõe-se na forma de anel ou em feixes isolados na margem da medula (Metcalf; Chalk, 1950). Ainda de acordo com o mesmo autor, o xilema forma um cilindro contínuo, percorrido por raios estreitos. Os elementos traqueais são tipicamente pequenos, como em *Rauvolfia*, ou às vezes

grandes ou solitários em alguns gêneros. Estes organizam-se tipicamente em numerosos múltiplos, frequentemente com 4 ou mais células, e às vezes com pequenos grupos, múltiplos alongados, produzindo um padrão radial, possuindo fibras delimitadas e de lúmen reduzido. Cronquist (1981) ainda acrescenta que os raios do lenho são geralmente estreitos, com 1-5 células de largura, com células parenquimáticas de diversos tipos.

Idioblastos contendo compostos fenólicos e laticíferos são encontrados no córtex, no floema e na medula de *H. lancifolius* e *R. sellowii*. Metcalfe & Chalk (1950) relatam que laticíferos estão sempre presentes nos caules de Apocynaceae e geralmente situam-se no córtex, no periciclo, no floema, na medula e algumas vezes nos raios medulares.

As cascas dessecadas de *H. lancifolius* e *R. sellowii*, no âmbito farmacognóstico, são consideradas drogas vegetais. Em todas as plantas, a natureza da casca é uma importante ferramenta para o diagnóstico e pode ser uma chave complementar na identificação vegetal (Mauseth, 1988). Denomina-se de casca ao conjunto de tecidos localizados externamente ao câmbio²², nos caules e nas raízes. Considerar o termo casca como sinônimo de periderme constitui-se num erro, pois a casca deve incluir, além de súber, o felogênio, a feloderme e, obrigatoriamente, o floema (Oliveira et al., 1991). Os caracteres microscópicos comuns às cascas de *H. lancifolius* e *R. sellowii*, cujo crescimento secundário já foi atingido, são várias camadas de súber e parênquima cortical, e em seguida grupos de células pétreas e fibras, totalmente lignificadas, na forma de uma bainha envolvendo o floema externo.

Segundo Esau (1974) e Scatena & Scremin-Dias (2006), as células-pétreas são esclereídes que encontram-se isoladas ou em grupos esparsos, por todo o sistema fundamental da planta. Essas células possuem paredes secundárias espessas, muito lignificadas, não constituem um tecido definido e se encontram em camadas mais ou menos extensas ou formando aglomerados de células. As células-pétreas desenvolvem-se principalmente no córtex e na casca do caule. O processo de esclerificação frequentemente resulta em uma casca mais forte, que não se destaca facilmente da árvore. Cascas espessas são resultado da expansão circunferencial contínua do crescimento secundário, sendo esticadas tangencialmente e formando fissuras e depressões profundas (Mauseth, 1988).

²² Meristema lateral do qual se originam tecidos vasculares secundários, ou seja, xilema e floema secundários.

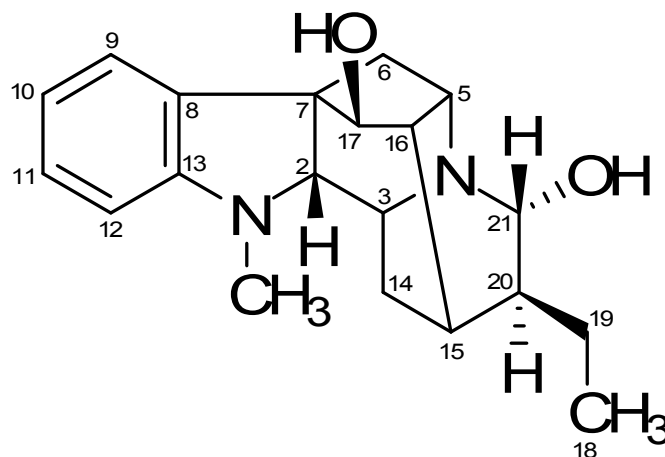
4.2. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DAS CASCAS CAULINARES DE *H. lancifolius*

4.2.1. HLA – *ajmalina*

O composto HLA foi isolado na forma de cristais esbranquiçados, solúveis em CHCl_3 ou CH_2Cl_2 , com ponto de fusão entre 150-156 °C e $R_f = 0,35$ (tolueno:dietilamina, 10:1, v/v). O espectro de UV apresentou duas bandas de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$, CHCl_3) em 253 e 297 nm, características de alcaloides com núcleo di-hidroindol, sendo que a banda em 253 nm é característica de núcleo indolínico (Sabri; Court, 1978).

O espectro de massas apresentou íon molecular em m/z 327 ($M^+ + 1$), correspondendo a massa de m/z 326 (M^+) para um composto com fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$. Foram observados fragmentos de maior intensidade em m/z 210 (7), 194 (7), 182 (8), 158 (18), 157 (5), 144 (21) e 110 (5) (Espectro 1).

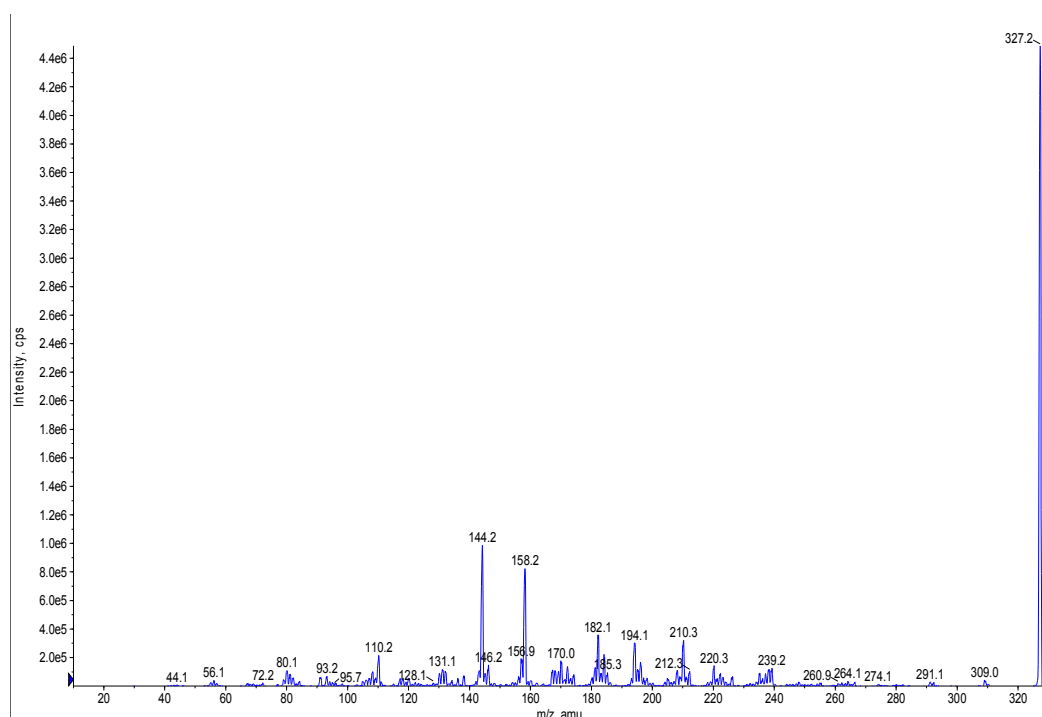
Os dados sugerem a possibilidade de HLA ser a ajmalina. Nos alcaloides indólicos do tipo ajmalina, a estereoquímica em C-2 pode ser determinada por espectrometria de massas. Quando o hidrogênio ligado ao C-2 está na posição *cis* em relação à ponte C-7—C-17, ocorre uma migração deste hidrogênio para o C-17, gerando os íons m/z 182 e 183. O íon m/z 182 (Esquema 5), característico do íon carbazolínio ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}^+$), pode ser formado também pelo fragmento $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2^+$, decorrente da eliminação dos carbonos C-14 ao C-21, sem rearranjo de hidrogênio (Cordell, 1981).



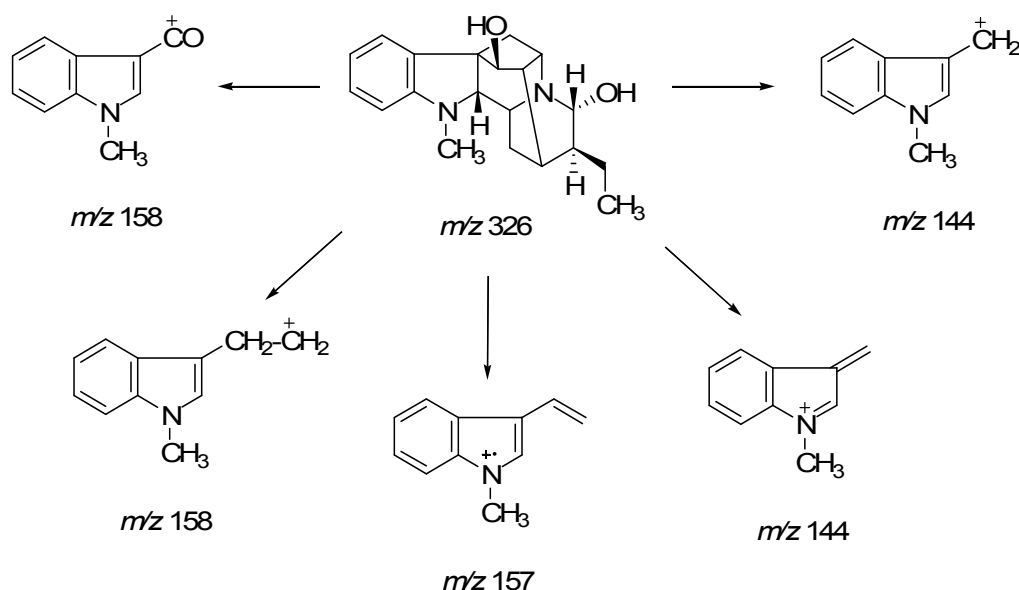
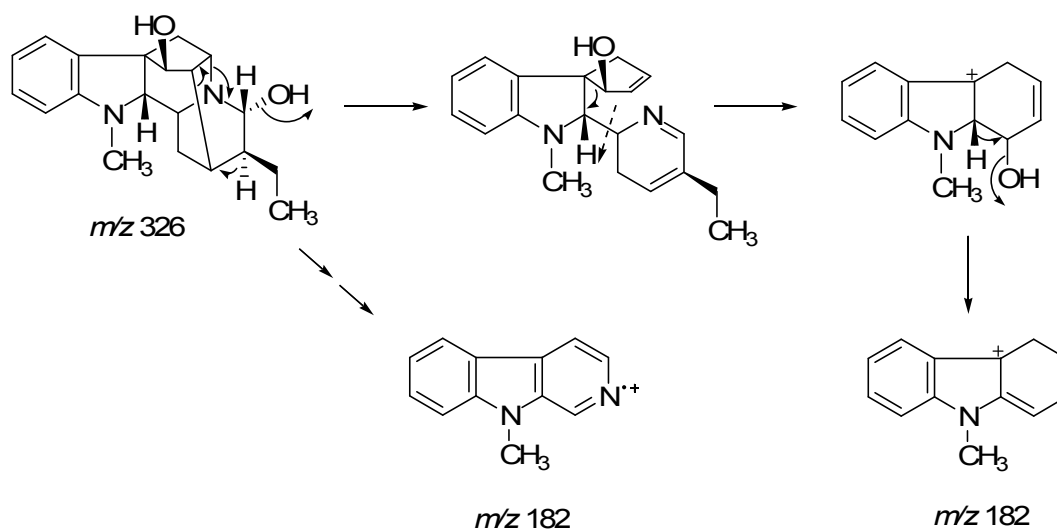
VI

Segundo Budzikiewicz e colaboradores (1964), fragmentos contendo o sistema β -carbolínico inteiro não são típicos da classe da ajmalina. Preferencialmente, ocorre um colapso, propiciando a formação de íons incluindo o núcleo indólico juntamente com um ou dois carbonos adicionais, um modo de comportamento evidentemente associado à ligação C-7—C-17.

O íon m/z 158 ($C_{10}H_8NO^+$ e/ou $C_{11}H_{12}N^+$), encontrado em todos os derivados da ajmalina, é característico do núcleo *N*-metilindólico contendo uma ligação C-7—C-17 e um grupo hidroxila em C-17. O íon m/z 157 ($C_{11}H_{11}N^+$) e o íon m/z 144 ($C_{10}H_{10}N^+$) apontam para a presença de um sistema *N*-metilindólico com dois (C-5 e C-6) ou um (C-6) átomo adicional de carbono, respectivamente, e são característicos de alcaloides indólicos *N*-metilsubstituídos (Esquema 6) (Biemann et al., 1964).



Espectro 1. Perfil de fragmentação MS/MS de HLA por *electrospray* em modo positivo ($DP= 40$, $EP= 10$, $CE= 20$, $CXP= 3,8$; $IS= 5500$; $CAD= 5$; $CUR= 10$; $Gas 1= 15$).



O espectro de RMN- ^1H apresentou as informações mais importantes para a definição da estrutura de HLA (Espectros 2-6). A presença de dois dubletos em δ 7,44 ($J = 7,4$ Hz) e δ 6,63 ($J = 7,8$ Hz) e dois tripletos em δ 7,14 ($J = 7,7$ Hz) e δ 6,77 ($J = 7,5$ Hz) é característica de anel aromático indólico sem substituição, correspondentes aos prótons em H-9 e H-12, e, H-11 e H-10, respectivamente. De acordo com Schripsema & Verpoorte (1991), esse padrão de sinais é típico de hidrogênios aromáticos de derivados indolínicos, como é o caso de alcaloides como ajmalina, isoajmalina, picralina e diacetilsandwichina. Este padrão é caracterizado pela ausência do sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (-NH), uma

vez que esse nitrogênio encontra-se substituído, e também pela ordem sequencial dos sinais, de campo mais desblindado para mais blindado: um dubleto de H-9, um tripleto de H-11, um tripleto de H-10 e um dubleto de H-12. O sinal referente a H-9 encontra-se em região mais desblindada, entre δ 7,4 e 7,5, devido a proximidade espacial com o substituinte oxigenado (-OH) ligado no C-17. Neste caso, o C-17 apresenta configuração 17*R*. O grupo hidroxila ligado ao C-17 está no plano do anel aromático próximo ao H-9.

Outros sinais importantes são um singlete para 3H em δ 2,78, indicando a presença de N-CH₃, condizente com aminas cíclicas (δ 3,0-0,5), enquanto que um tripleto em δ 0,96 ($J = 7$ Hz, 3H) e a presença de um multipeto em δ 1,4-1,5 (2H) indicam a presença de um grupo etila terminal. Três singletos para 1H em δ 2,65, δ 4,29 e δ 4,44 indicam a presença de prótons mais desblindados, devido à proximidade do primeiro a um nitrogênio e, dos últimos, a grupamentos hidroxilas, que apresentam maior deslocamento químico. Sendo HLA a ajmalina, os singletos poderiam ser referentes aos prótons H-2, H-17 e H-21.

Em virtude da dificuldade para atribuir os sinais de RMN-¹³C à estrutura, HLA foi analisado em dois equipamentos com frequências diferentes. Para fins de descrição, assumiu-se os valores de δ medidos em 50 MHz como oficiais, porém comparando-os com os sinais obtidos em 75 MHz. Nesta última frequência, alguns sinais não foram observados, provavelmente em decorrência da baixa concentração da amostra ou da obtenção apenas do mínimo *scan*. Em todo o caso, os sinais de RMN-¹³C de todos os carbonos de HLA, obtidos nas duas análises, podem ser conferidos na Tabela 2. O espectro de RMN-¹³C (Espectros 7 e 8) revela a presença de carbonos *sp*³ em δ 56,17 (C-7) e δ 79,30 (C-2), o que sugere que a molécula tenha um esqueleto do tipo ajmalano. Os C-17 e C-21, com funções oxigenadas -OH, apresentam deslocamentos em δ 77,71 e δ 88,18. Também foram observados sinais de carbonos aromáticos, entre δ 109,53 a 153,71 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios e aos carbonos de HLA podem ser verificados nas Tabelas 1 e 2.

A análise dos dados e comparação com dados da literatura (Tabelas 1 e 2) sugerem que a estrutura de HLA corresponde à **ajmalina (VI)**.

Tabela 1. Dados do espectro de RMN-¹H de HLA em comparação com dados da literatura (δ ppm, multiplicidade, constante de acoplamento J).

H	HLA ^a	ajmalina ^b
H-2	2,65 (s)	2,65 (s)
H-3	3,60 (br d, $J= 9,5$ Hz)	3,61 (br d, $J_{3,14\alpha}= 9$ Hz)
H-5	3,05 (m)	3,02 (m)
H-6 α	2,05-2,09 (m)	2,06 (br d)
H-6 β	1,93-1,98 (dd, $J= 5$ Hz, $J= 12$ Hz)	1,96 (dd, $J_{5,6\beta}= 5$ Hz; $J_{6\alpha,6\beta}= 12$ Hz)
H-9	7,44 (d, $J= 7,35$ Hz)	7,44 (d)
H-10	6,77 (t, $J= 7,5$ Hz)	6,77 (t)
H-11	7,14 (t, $J= 7,7$ Hz)	7,14 (t)
H-12	6,63 (d, $J= 7,8$ Hz)	6,64 (d)
H-14 α	1,85 (ddd, $J= 12,7$ Hz; $J= 10,6$ Hz)	1,85 (ddd, $J_{14\alpha,14\beta}= 13,5$ Hz)
H-14 β	1,48 (m)	1,49 (ddd)
H-15	2,28 (m)	2,29 (m)
H-16	2,05-2,09 (m)	2,0 (m)
H-17	4,44 (s)	4,44 (s)
H-18	0,96 (t, $J= 7$ Hz)	0,96 (t, $J_{18,19}= 7$ Hz; $J_{18,19}= 7$ Hz)
H-19	1,4 (m)	1,4 (m)
H-19'	1,5 (m)	1,5 (m)
H-20	1,5 (m)	1,5 (m)
H-21	4,29 (br s)	4,27 (br s)
N-CH ₃	2,78 (s)	2,78 (s)

a. CDCl₃, 300 MHz (Dep. de Ciências Farmacêuticas, USP-RP)

b. Jokela & Lounasmaa, 1996 (CDCl₃, 300 MHz)

Tabela 2. Dados do espectro de RMN-C¹³ e experimento DEPT de HLA em comparação com dados da literatura (δ , ppm).

C	HLA ^a	HLA ^b	ajmalina ^c	DEPT ^{a,b}
C-2	79,3	79,1	79,1	CH
C-3	43,0	n.o.	42,8	CH
C-5	52,7	n.o.	53,1	CH
C-6	34,7	34,6	34,6	CH ₂
C-7	56,2	56,2	56,2	Cq
C-8	133,3	133,0	133,0	Cq
C-9	122,7	122,7	122,6	CH
C-10	119,1	119,2	119,2	CH
C-11	127,3	127,4	127,4	CH
C-12	109,5	109,6	109,6	CH
C-13	153,7	153,7	153,7	Cq
C-14	31,4	31,3	31,3	CH ₂
C-15	28,2	28,2	28,2	CH
C-16	45,2	45,3	45,2	CH
C-17	77,7 *	77,8	77,9	CH
C-18	12,2	12,2	12,1	CH ₃
C-19	25,4	n.o.	25,7	CH ₂
C-20	48,0	n.o.	48,1	CH
C-21	88,2	n.o.	88,6	CH
N-CH ₃	34,2	34,2	34,2	CH ₃

* sobreposto ao sinal do CDCl₃

a. CDCl₃, 50 MHz (Dep. de Química, UFPR)

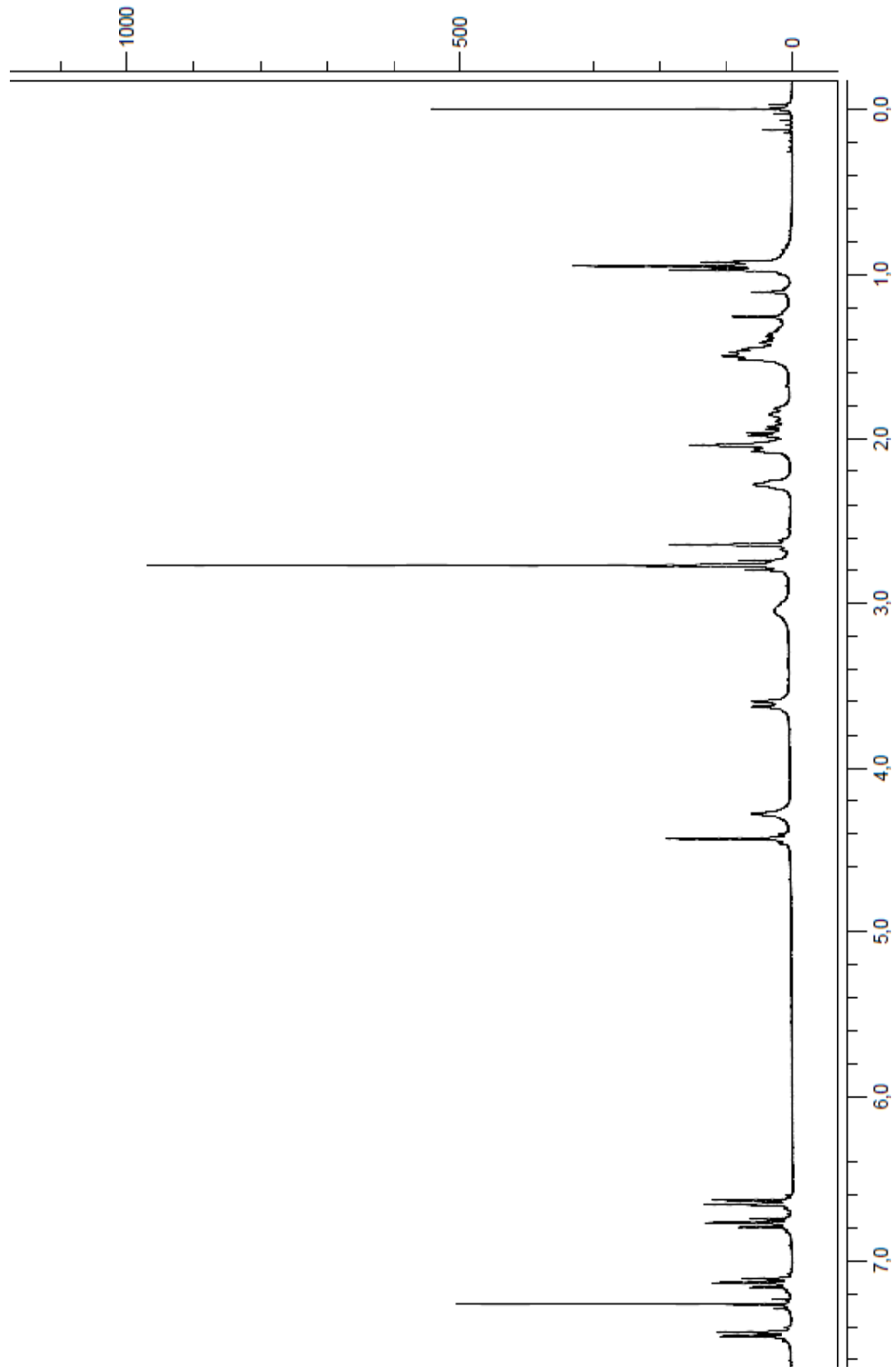
b. CDCl₃, 75 MHz (Dep. de Ciências Farmacêuticas, USP-RP)

c. Jokela & Lounasmaa, 1996 (CDCl₃, 100 MHz)

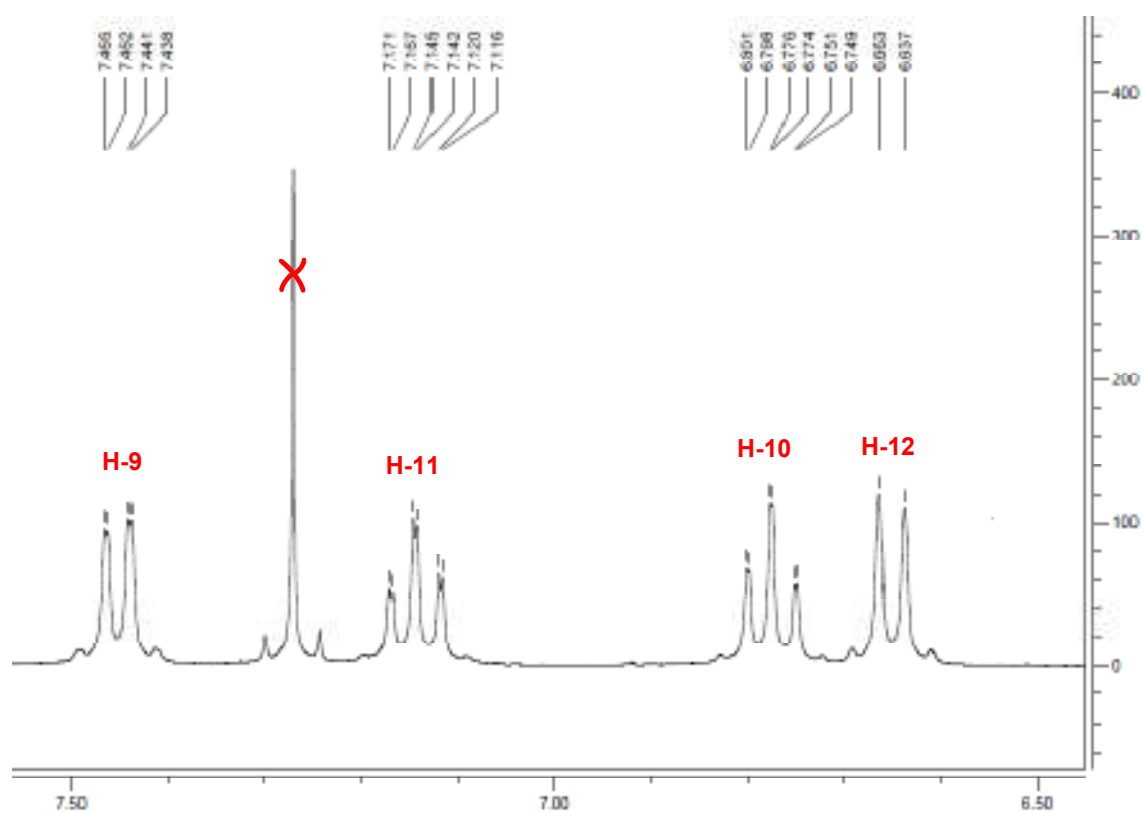
n.o.= não observado

Cq= carbono quaternário

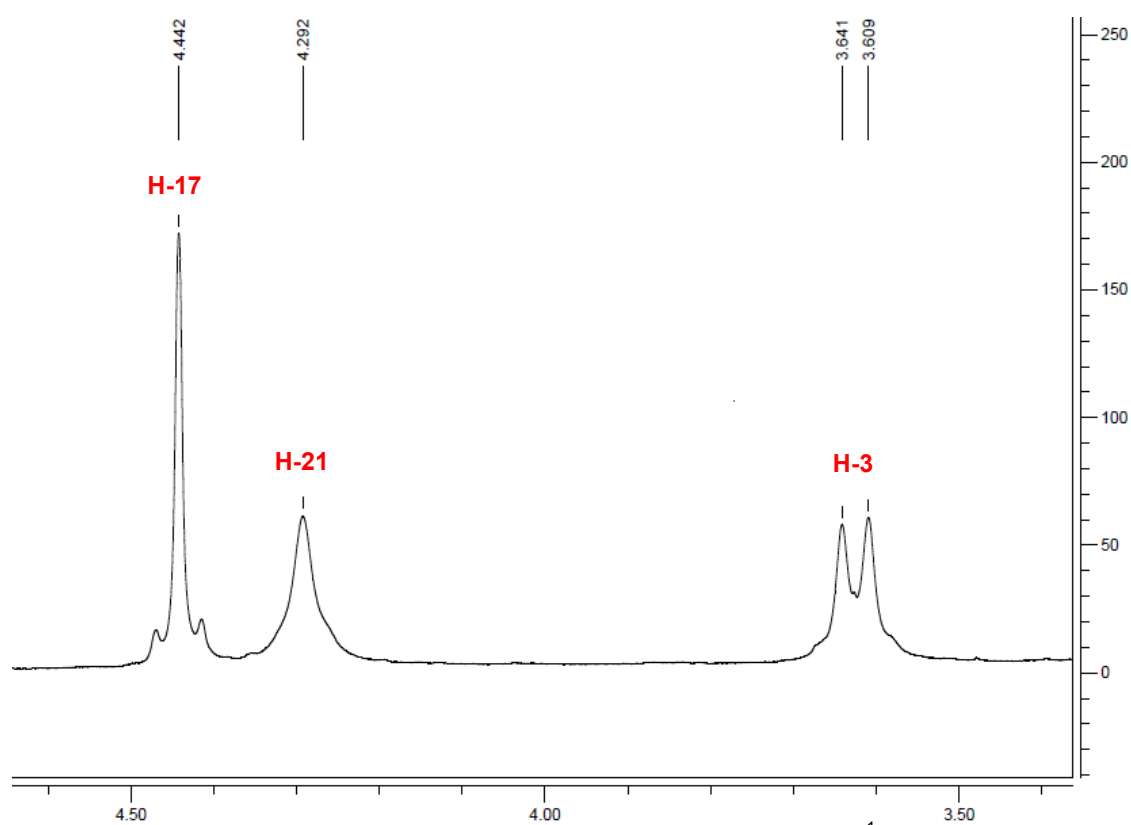
Apesar de não possuírem um sistema β -carbolínico intacto, os alcaloides derivados da ajmalina (esqueleto do tipo ajmalano) são estruturalmente relacionados aos alcaloides do tipo sarpagina, uma vez que apenas uma ligação entre C-7 e C-17 nos tipos ajmalano precisa ser formada para converter um grupo ao outro (Cordell, 1981). A ajmalina tem sido encontrada em diversas espécies da família Apocynaceae, destacando os gêneros *Aspidosperma*, *Picralina*, *Rhazya* e *Strychnos*. Especificamente, a ajmalina é bastante comum em espécies como *Catharanthus roseus* e *Rauvolfia serpentina* (Dewick, 2002; Aniszewski, 2007). No entanto, é a primeira vez que este alcaloide indólico é relatado para uma espécie do gênero *Himatanthus*.



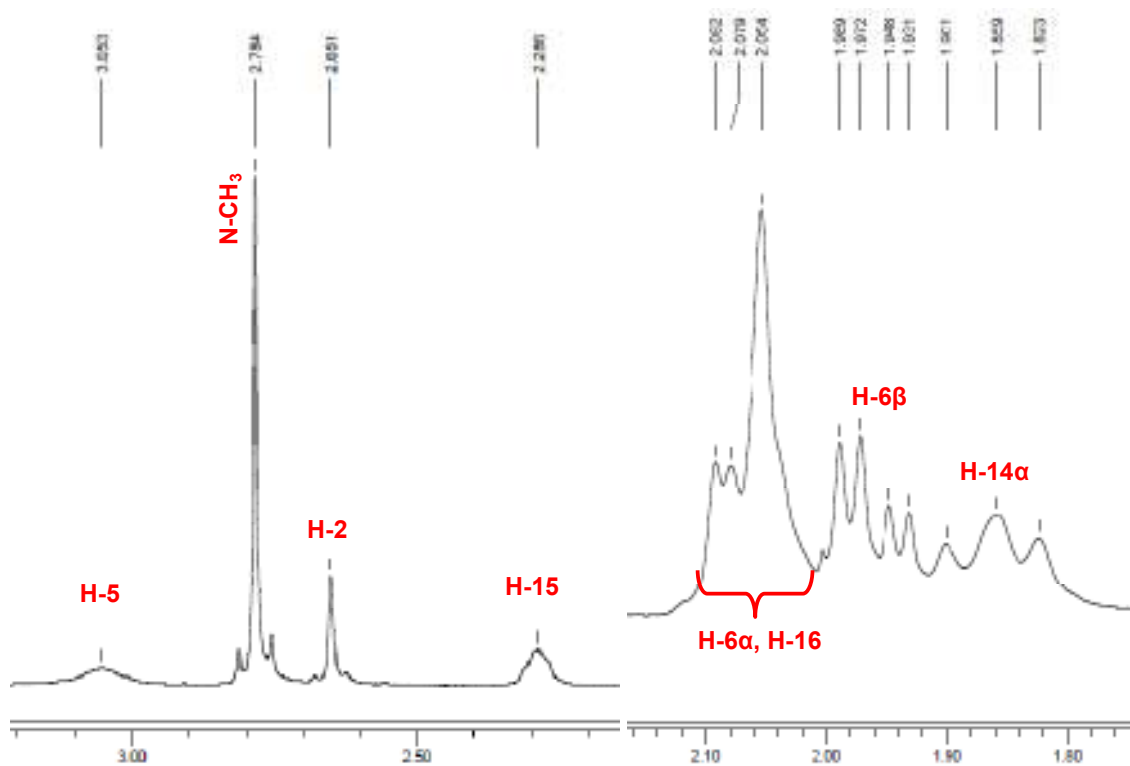
Espectro 2. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm).



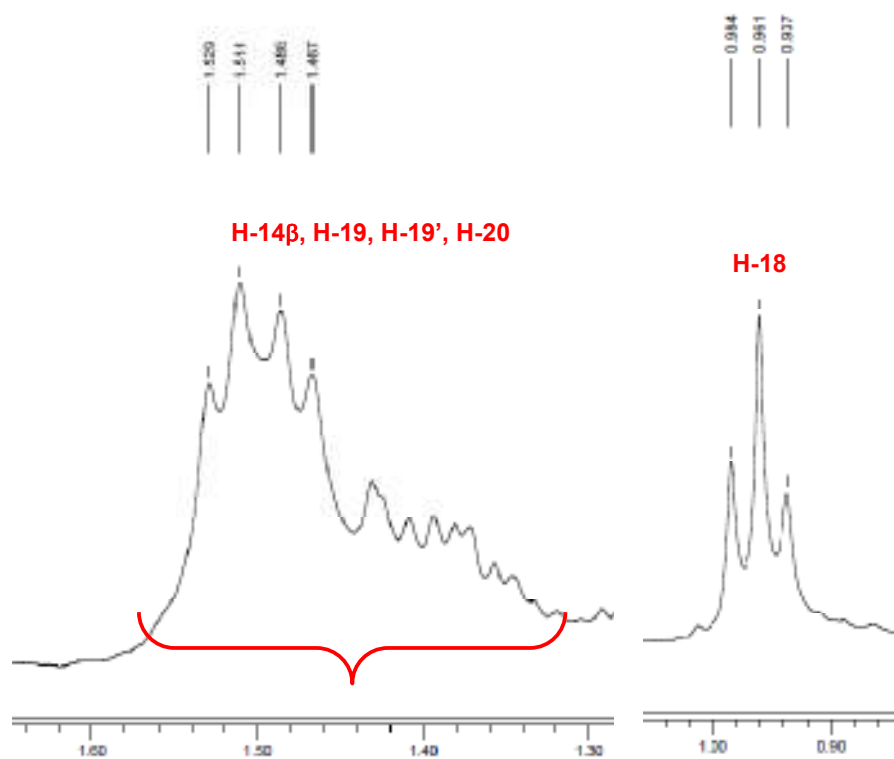
Espectro 3. Expansão da região de hidrogênios aromáticos (δ 7,50-6,50 ppm) do espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm).



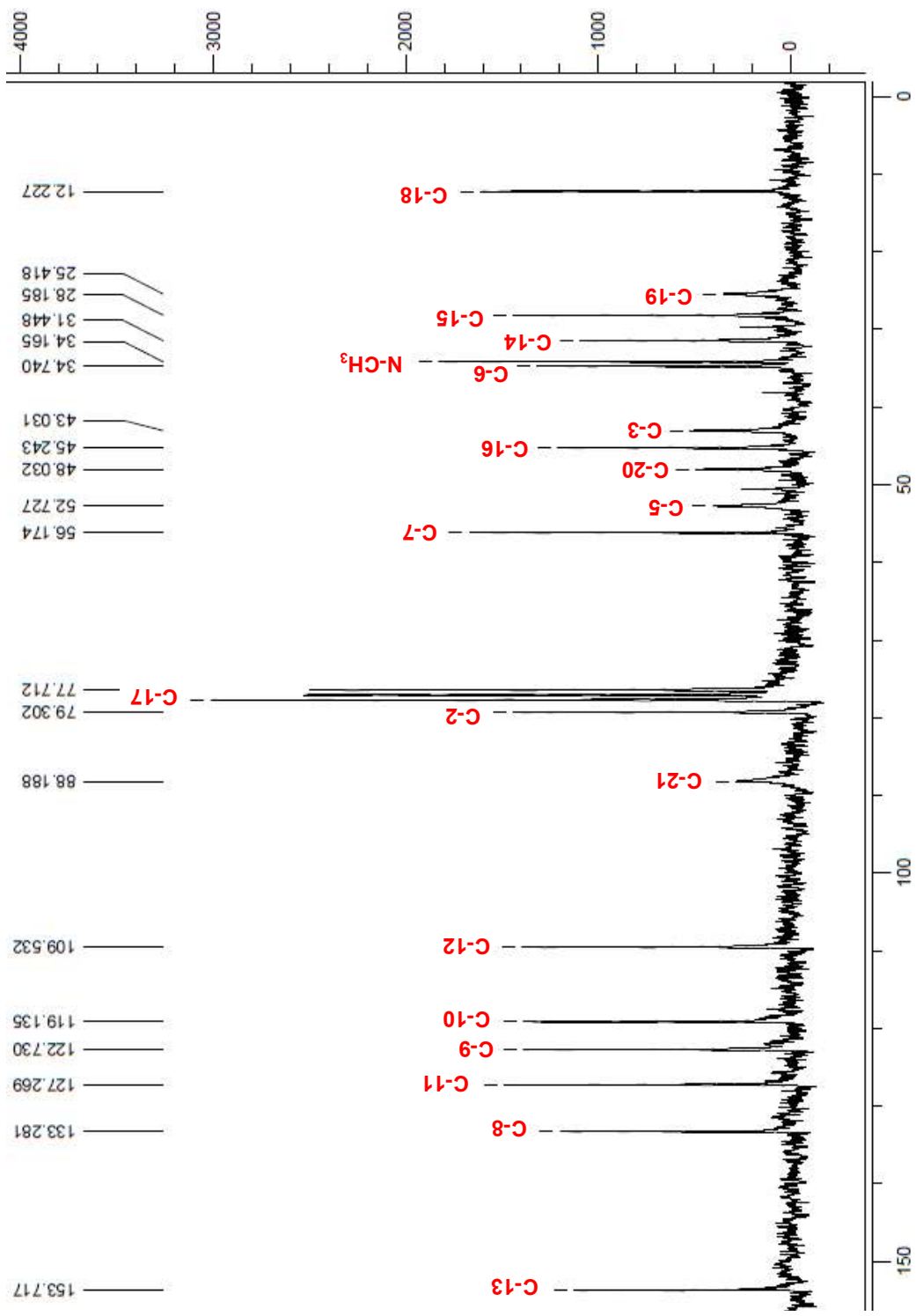
Espectro 4. Expansão da região de δ 4,50 a 3,50 ppm do espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm).



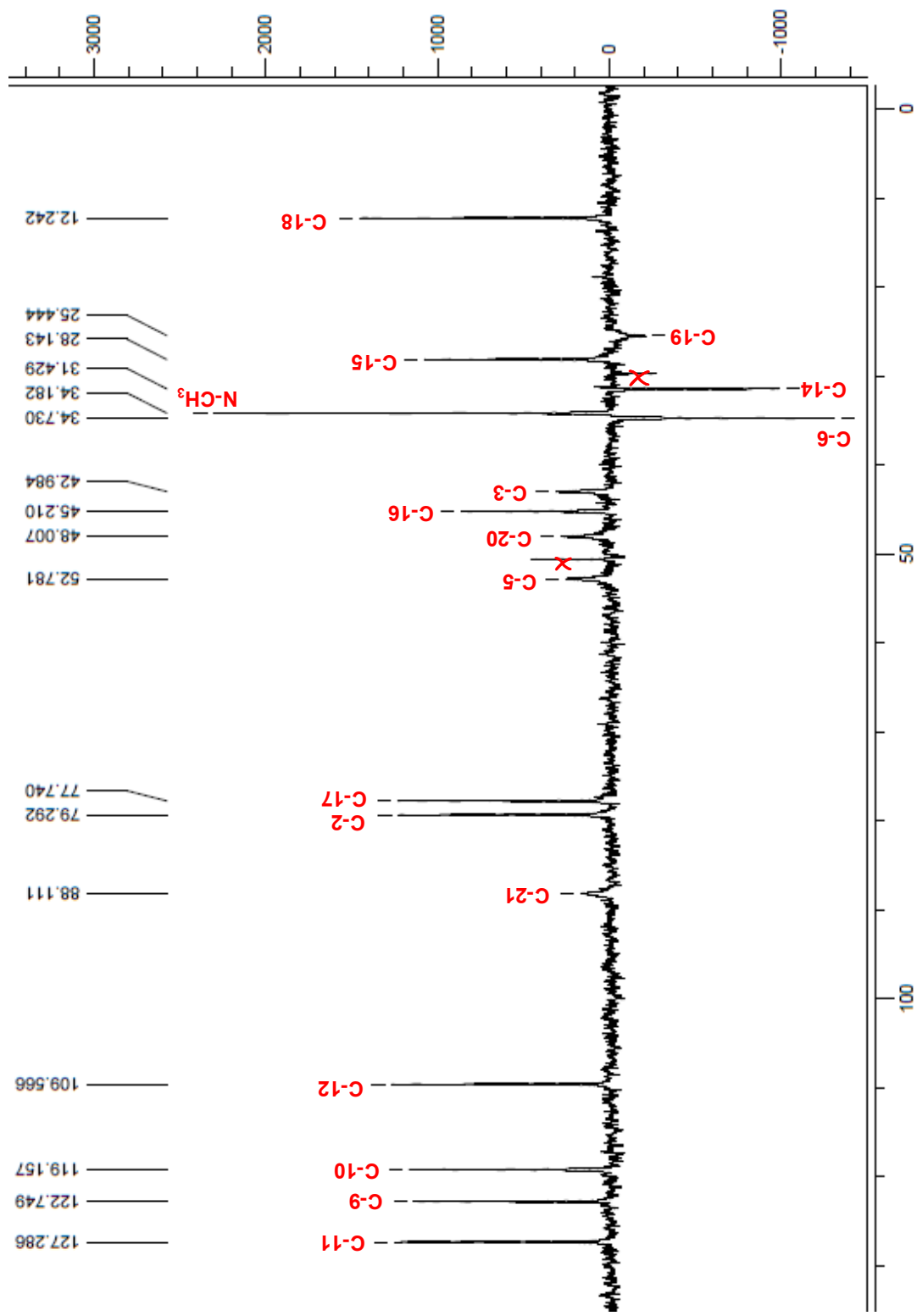
Espectro 5. Expansão da região de δ 3,05 a 1,80 ppm do espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm).



Espectro 6. Expansão da região de δ 1,60 a 0,85 ppm do espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm).



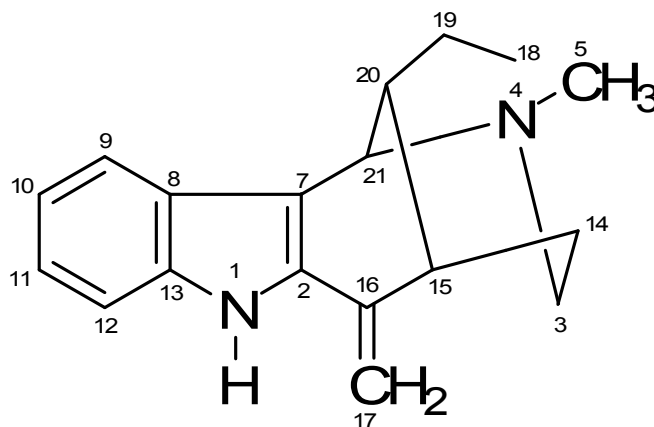
Espectro 7. Espectro de RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm). * C-17 sobreposto ao sinal do CDCl_3 (δ 77,7 ppm)



Espectro 8. Espectro de RMN- ^{13}C em experimento de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de HLA (δ ppm). * C-17 sobreposto ao sinal do CDCl_3 (δ 77,7 ppm).

4.2.2. HLB – *epi-uleína*

O composto HLB foi isolado na forma de um sólido amorfo amarelo, solúvel em CHCl_3 ou CH_2Cl_2 , com $R_f = 0,66$ (tolueno:dietilamina, 10:1, *v/v*). Análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura indicaram que HLB corresponde ao isômero da uleína, a ***epi-uleína*** (XXVII).



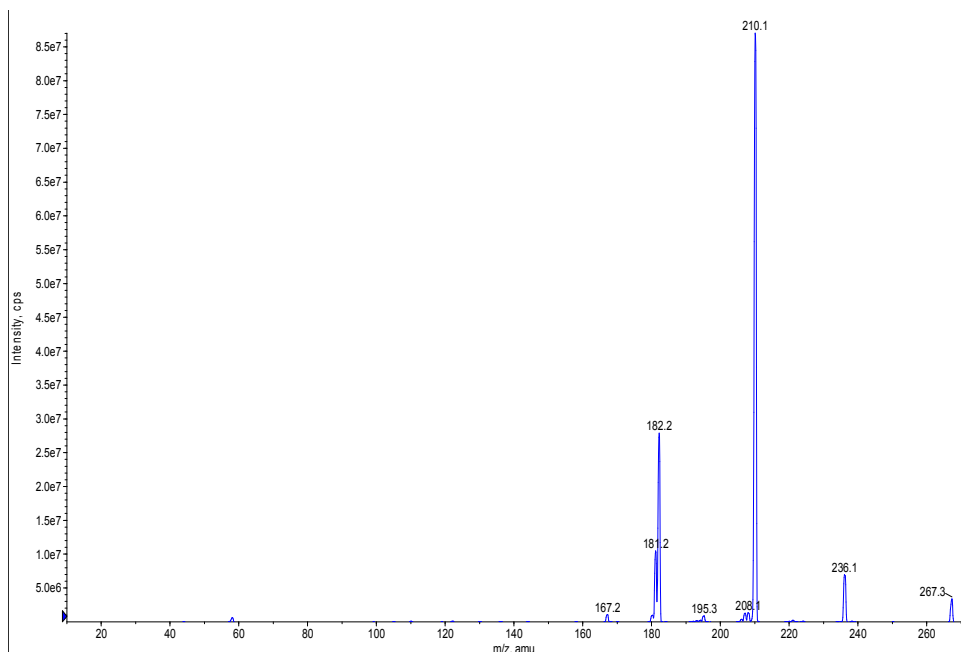
XXVII

O espectro de UV apresentou três bandas de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$, CHCl_3) em 237, 302 e 312,5 nm, características do núcleo α -vinil-indólico (Cordell, 1981). O espectro de massas apresentou íon molecular em m/z 267 ($M^+ + 1$), correspondendo a massa de m/z 266 (M^+) para um composto com fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$. Foram observados fragmentos em m/z 235 (8), 209 (100), 207 (1), 194 (1), 181 (32), 180 (12) e 166 (1) (Espectro 9). Os dados da literatura relatados por Budzikiewicz e colaboradores (1964), Borris e colaboradores (1983) e Jácome e colaboradores (2004) corroboram com a estrutura da *epi-uleína* (XXVII), o isômero da uleína (IV).

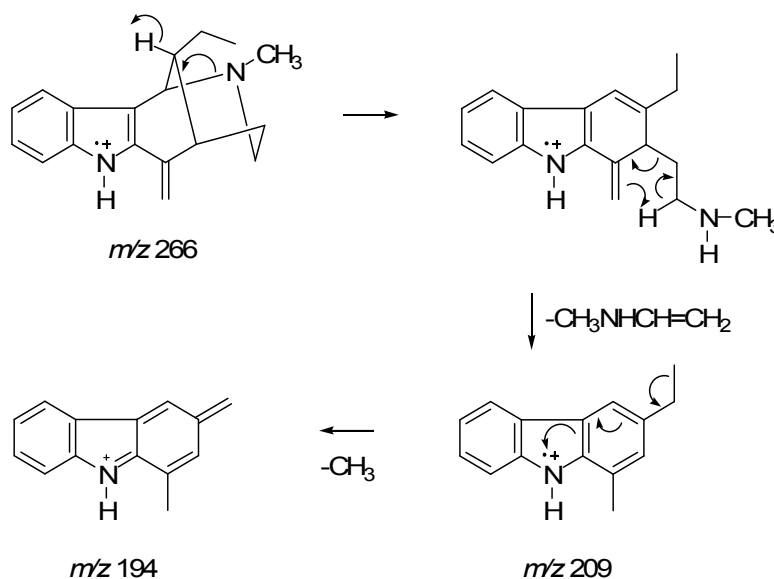
O íon carbazólico em m/z 209 é gerado pela fissão homolítica da ligação $\text{N}_b\text{—C-21}$ do íon molecular m/z 266. C-20 cede o átomo de hidrogênio para N_b , decompondo-se para um estado de transição cíclico de seis membros. A ligação dupla exocíclica sofre rearranjo, sendo internalizada, com perda de grupo enamina, gerando um íon carbazólio, o qual, por perda de metila, gera o íon m/z 194 (Esquema 7) (Budzikiewicz et al., 1964).

Os fragmentos m/z 180 e 181 podem ser explicados pela clivagem de alguma ligação do íon molecular na posição alilicamente lábil C-14—C-15. O íon

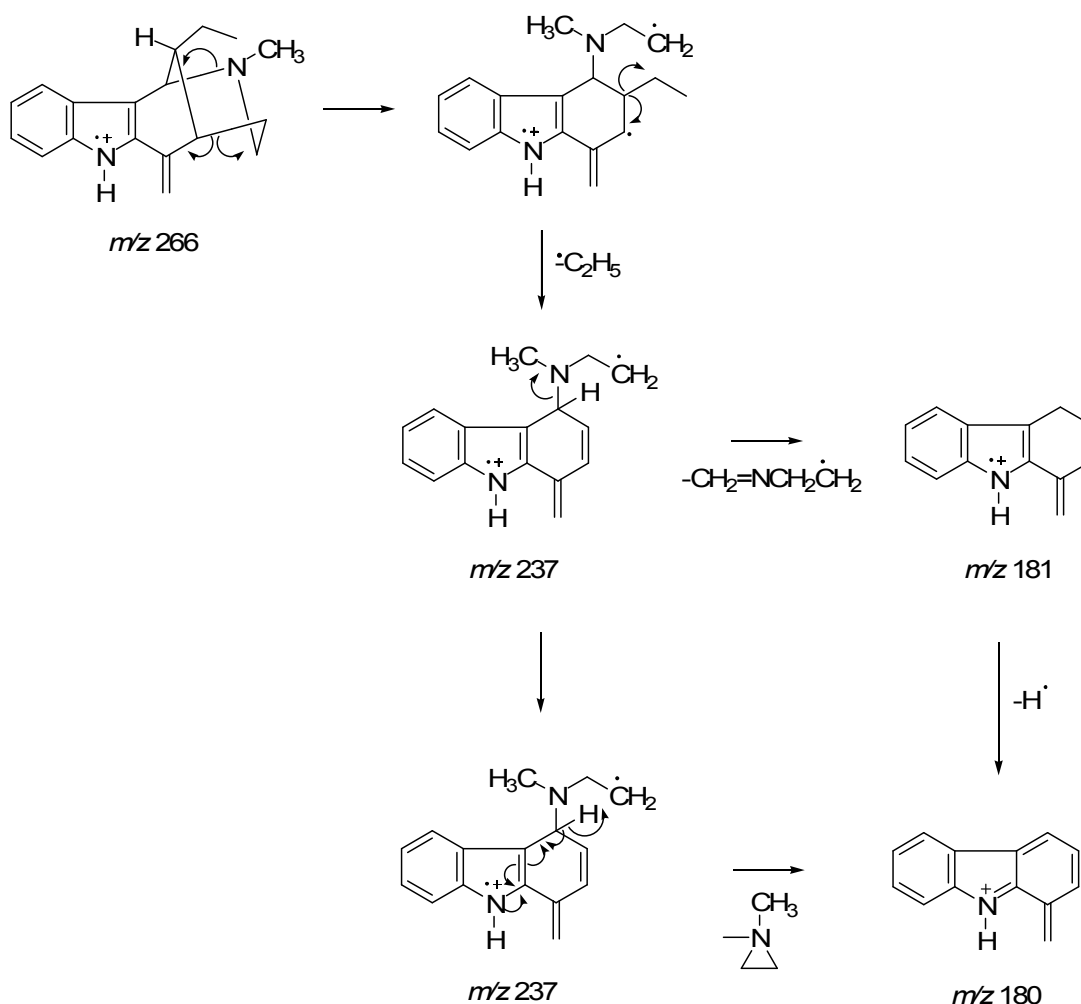
resultante perderia um radical etila, formando o fragmento m/z 237, o qual poderia sofrer perda da cadeia lateral contendo amina, na forma de aziridina *N*-metilada para gerar a espécie conjugada m/z 180. A perda do substituinte em C-21, com transferência do hidrogênio do grupo N_b -metila em m/z 237, geraria m/z 181, enquanto a subsequente perda benzílica do hidrogênio C-21 em m/z 181 geraria a espécie conjugada m/z 180 (Esquema 8) (Budzikiewicz et al., 1964).



Espectro 9. Perfil de fragmentação MS/MS de HLB por *eletrospray* em modo positivo ($DP= 40$, $EP= 10$, $CE= 20$, $CXP= 3,8$; $IS= 5500$; $CAD= 5$; $CUR= 10$; $Gas 1= 15$).



Esquema 7. Formação dos fragmentos m/z 209 e 194 de HLB.



Esquema 8. Formação dos fragmentos m/z 181 e 180 de HLB.

No espectro de RMN-¹H de HLB (Espectros 10-13), observaram-se sinais de hidrogênios característicos de -NH (δ 8,53; s), núcleo aromático (δ 7,1-7,7), olefina (δ 5,25; s, e δ 4,98; s) e também hidrogênios em região mais blindada (δ 4,15-1,0). Os sinais referentes a cada hidrogênio de HLB podem ser verificados na Tabela 3.

O espectro de RMN-¹H apresentou um tripleto em δ 1,01 ($J = 7,4$ Hz), com sobreposição de outro sinal provavelmente decorrente de impureza, que corresponde aos hidrogênios de um grupo metila ligado a um metileno. Este último apresentou-se como um singleto em δ 1,25 (2H-19), confirmando a presença do grupo etila na estrutura (C-18—C-19).

A presença de dois singletos em δ 4,98 e δ 5,25 caracteriza hidrogênios em carbono sp^2 , típicos de grupamento metileno olefínico exocíclico (-CH=CH₂), correspondentes aos hidrogênios do C-17. Um dubleto em δ 4,15 ($J = 2,25$ Hz) é

atribuído ao hidrogênio do C-21, que faz a ligação entre o núcleo indólico e o N_b (Cordell, 1981).

Na região de hidrogênios aromáticos do espectro, entre δ 7,0 e δ 7,70, é possível observar o padrão espectral para alcaloides indólicos não substituídos. Este padrão, de um modo geral, é caracterizado por um sinal –NH em torno de 8 ppm, dois dubletos em δ 7,5 e δ 7,3 e, abaixo do sinal residual do CDCl₃, há dois tripletos, quando analisado em 300 MHz, geralmente com sobreposição de sinais (Schripsema; Verpoorte, 1991). No espectro de HLB, observou-se um singleto largo correspondente a –NH em δ 8,53, um tripleto para H-9 em δ 7,38 e um dubleto para H-12 em δ 7,69, um tripleto para H-11 em δ 7,18 e um dubleto para H-10 em δ 7,1. Os tripletos correspondentes aos H-9 e H-11 apresentam sobreposição com outros sinais, derivados provavelmente de alguma impureza.

De acordo com a literatura, os espectros de RMN-¹H para a *epi*-uleína e a uleína (**IV**) são semelhantes, mas diferem justamente em relação aos tripletos correspondentes ao radical CH₃ (C-18) do grupo etila, centrados em δ 1,01 para a *epi*-uleína e em δ 0,85 para a uleína. O grupo etila na uleína está sobre o sistema π -aromático e, portanto, espera-se para H₃-18 um sinal mais próximo ao TMS, devido à presença de blindagem dos elétrons π do anel indólico. Na *epi*-uleína o grupo etila está à direita e o mesmo sinal aparece em δ 1,01, presumidamente devido à combinação do efeito estérico do anel. A posição do grupamento etila é axial com relação ao anel piperidínico, já na uleína ele é equatorial. Assim, para a *epi*-uleína espera-se que a interação 1,3-diaxial ocorra entre o grupo etila e o próton axial em C-14. Isso resultaria em uma compressão estérica de C-14, C-20 e em menor extensão em C-18 e C-19 e deveria levar esses carbonos à ressonância em campos mais desblindados na *epi*-uleína que na uleína (Borris et al., 1983).

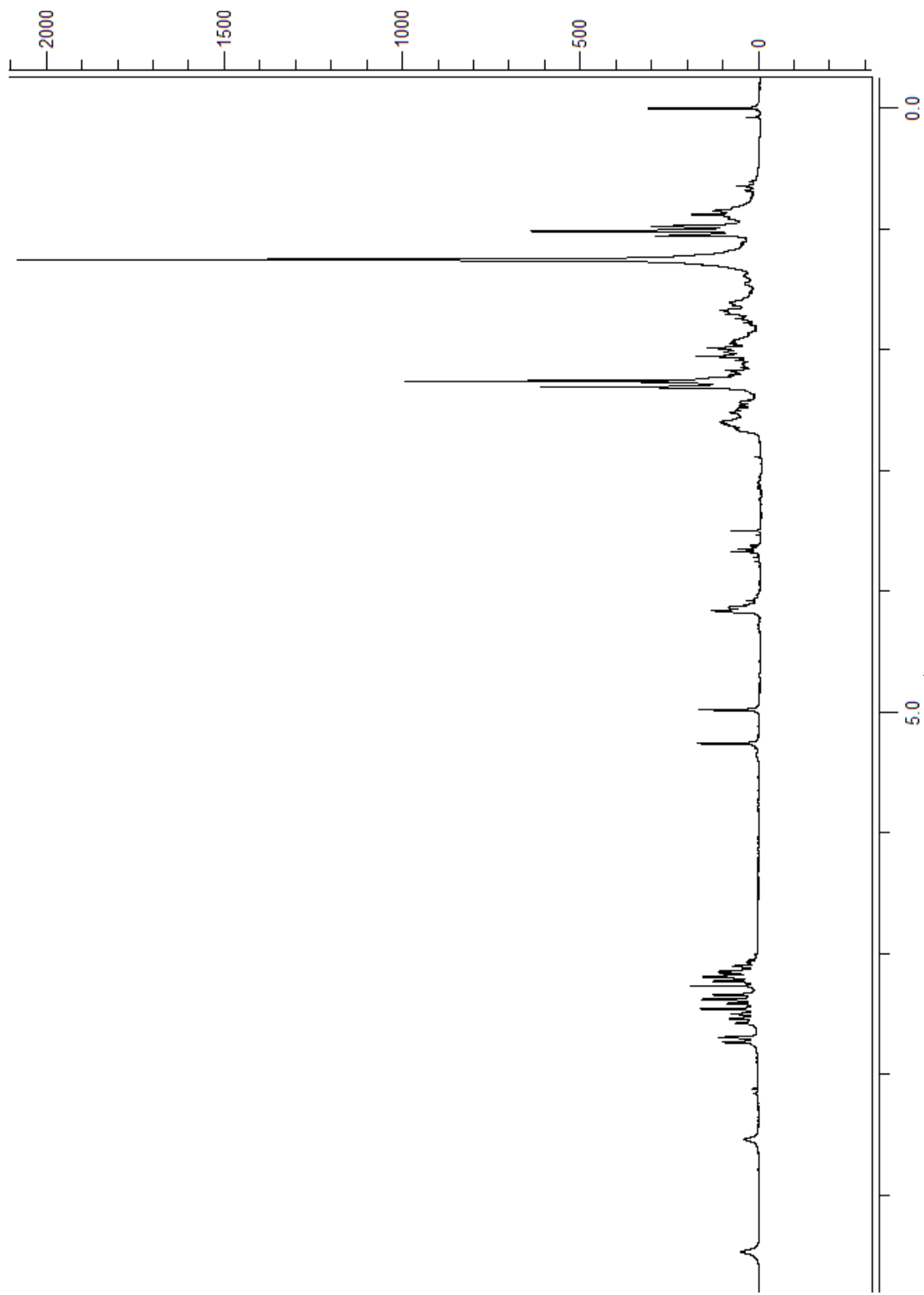
Alguns sinais não puderam ser atribuídos confiavelmente aos átomos de hidrogênio e carbonos de HLB, devido a presença de sinais muito próximos entre si. Isso pode ser devido ao fato de HLB não estar totalmente puro. Pela análise destes, provavelmente traços de uleína estavam presentes na amostra, dificultando a atribuição daqueles sujeitos aos mesmos efeitos estéricos tanto na *epi*-uleína quanto na uleína. Os sinais mais prováveis para cada carbono estão marcados por um asterisco (*). No entanto, os sinais característicos da *epi*-uleína puderam ser atribuídos com segurança.

No espectro de RMN-¹³C de HLB (Espectros 14-16) observou-se a presença de duas porções distintas na molécula, em conformidade com os resultados descritos na literatura. A primeira em região mais desblindada, com a presença de oito sinais, quatro referentes aos carbonos aromáticos C-9 (δ 119,47), C-10 (δ 120,08*/120,93), C-11 (δ 122,09/122,90*) e C-12 (δ 112,63), além de outros cinco sinais referentes a carbonos não-hidrogenados C-16 (δ 141,76), C-2 (δ 136,16), C-7 (δ 110,9), C-8 (δ 126,77) e C-13 (δ 136,54). Observou-se também um sinal em região de olefinas, referente ao C-17 (δ 105,21), do grupo metileno exocíclico terminal. Também verificou-se a presença de outros sinais, como C-21 (δ 54,78*/55,07), C-15 (δ 38,19) e C-20 (δ 44,64*/45,06), e sinais dos carbonos adjacentes ao N_b, tais quais C-3 (δ 46,20) e C-5 (δ 44,64/45,06*), além de C-14 (δ 28,20*/29,70) e da etila terminal com os C-19 (δ 23,36*/23,99) e C-18 (δ 12,13*/11,74). Os sinais referentes a cada carbono de HLB podem ser verificados na Tabela 4.

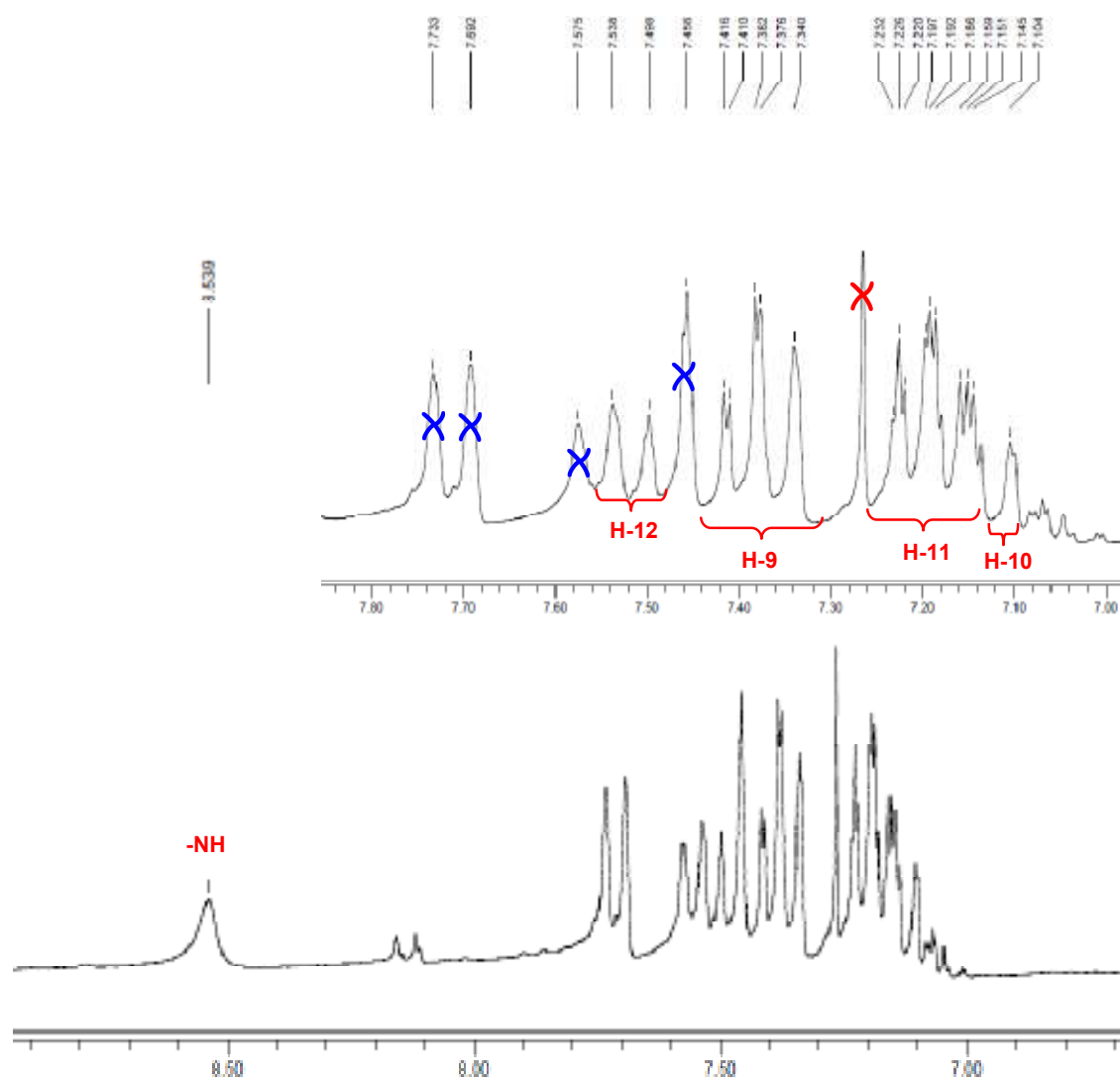
O sinal em δ 12,13*/11,74 foi assinalado para o grupo metila C-18, cuja ressonância em região blindada é presumível por ser o carbono mais protegido da estrutura. O sinal em δ 23,36*/23,99 pode ser atribuído ao C-19, pois a cadeia lateral etila está equatorial ao anel piperidínico, facilitando a interação 1,3-axial entre o grupo etila e o hidrogênio em C-14. Isso resultaria em uma compressão estérica de C-14 e C-20. Dessa forma, o sinal em δ 28,20*/29,70 pode ser atribuído ao C-14. Deslocamentos em direção a região menos blindada de C-15 e C-21 são provavelmente devido a um aumento na tensão estérica no anel piperidínico, resultante dessa interação.

Segundo Borris (1983), o sinal de RMN-¹³C do C-16 deveria ser o sinal em região mais desblindada nesta estrutura, seguido pelos C-13 e C-2, respectivamente. O C-7 assume uma substituição em campo mais desprotegido de δ 3,10 ppm de diferença entre a uleína e a *epi*-uleína, devido a liberação da tensão no anel ciclohexênico e/ou a remoção da compressão estérica. Pode-se assumir que a liberação da tensão do anel deveria ser sentida igualmente nos centros simetricamente substituídos, uma troca em campo mais baixo de magnitude similar poderia ser esperada para C-16. De fato, o sinal atribuído a C-16 na uleína (δ 138,7) muda para campo mais desblindado em 3,06 ppm de diferença na *epi*-uleína, enquanto que o sinal para C-2 (δ 135,5) muda para campo mais desblindado em 0,96 ppm e o C-13 permanece virtualmente inalterado.

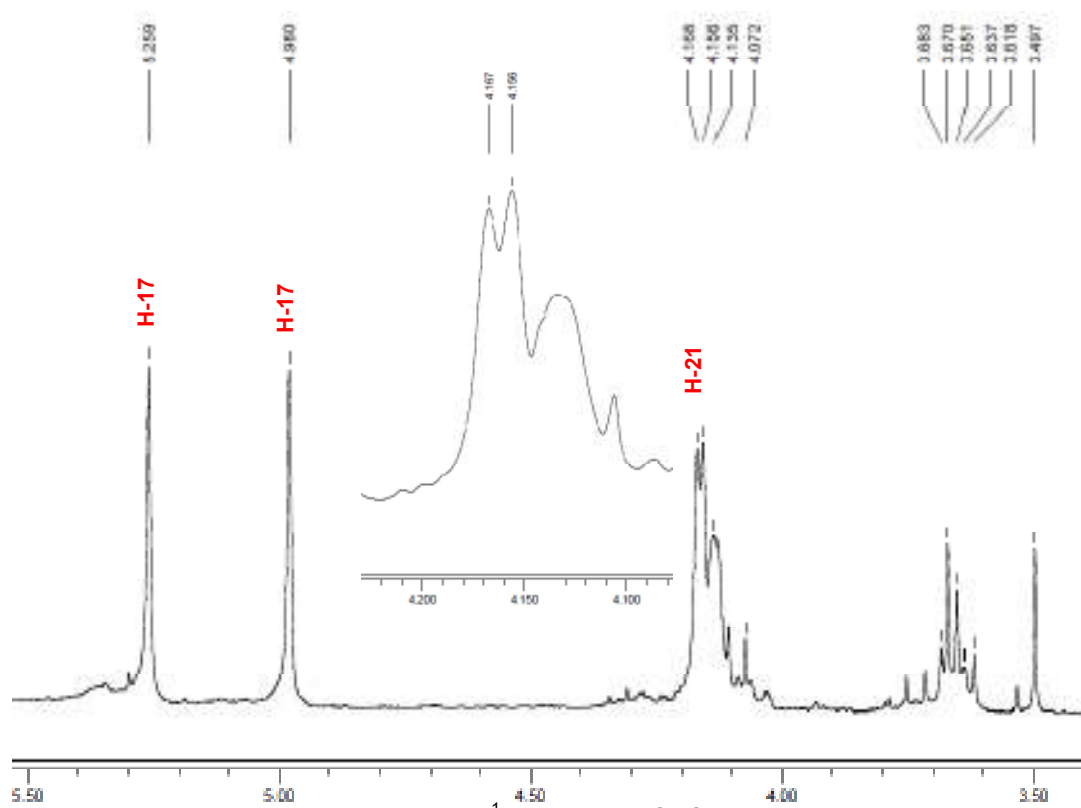
A *epi*-uleína é um alcaloide indólico isômero da uleína, que já foi previamente isolado em outras espécies da família Apocynaceae, como *Aspidosperma subincanum* K. von Mart. (Borris et al., 1983) e *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (Jácome et al., 2004), porém esta é a primeira vez que este composto é relatado oficialmente para *H. lancifolius*.



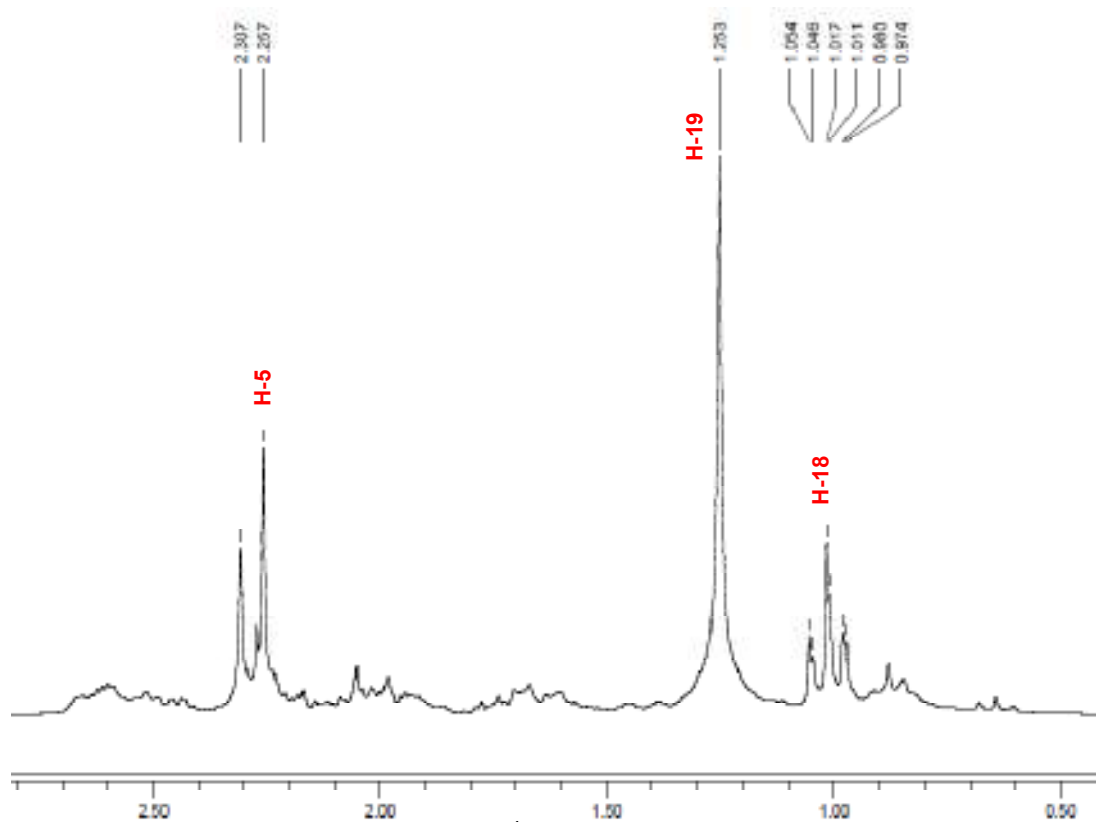
Espectro 10. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (200 MHz, CDCl_3) de HLB (δ ppm).



Espectro 11. Expansão do espectro de RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) na região entre δ 6,50 a 9,0 ppm de HLB (δ ppm).



Espectro 12. Expansão do espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) na região entre δ 3,50 a 5,50 ppm de HLB (δ ppm).



Espectro 13. Expansão do espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) na região entre δ 0,50 a 3,00 ppm de HLB (δ ppm).

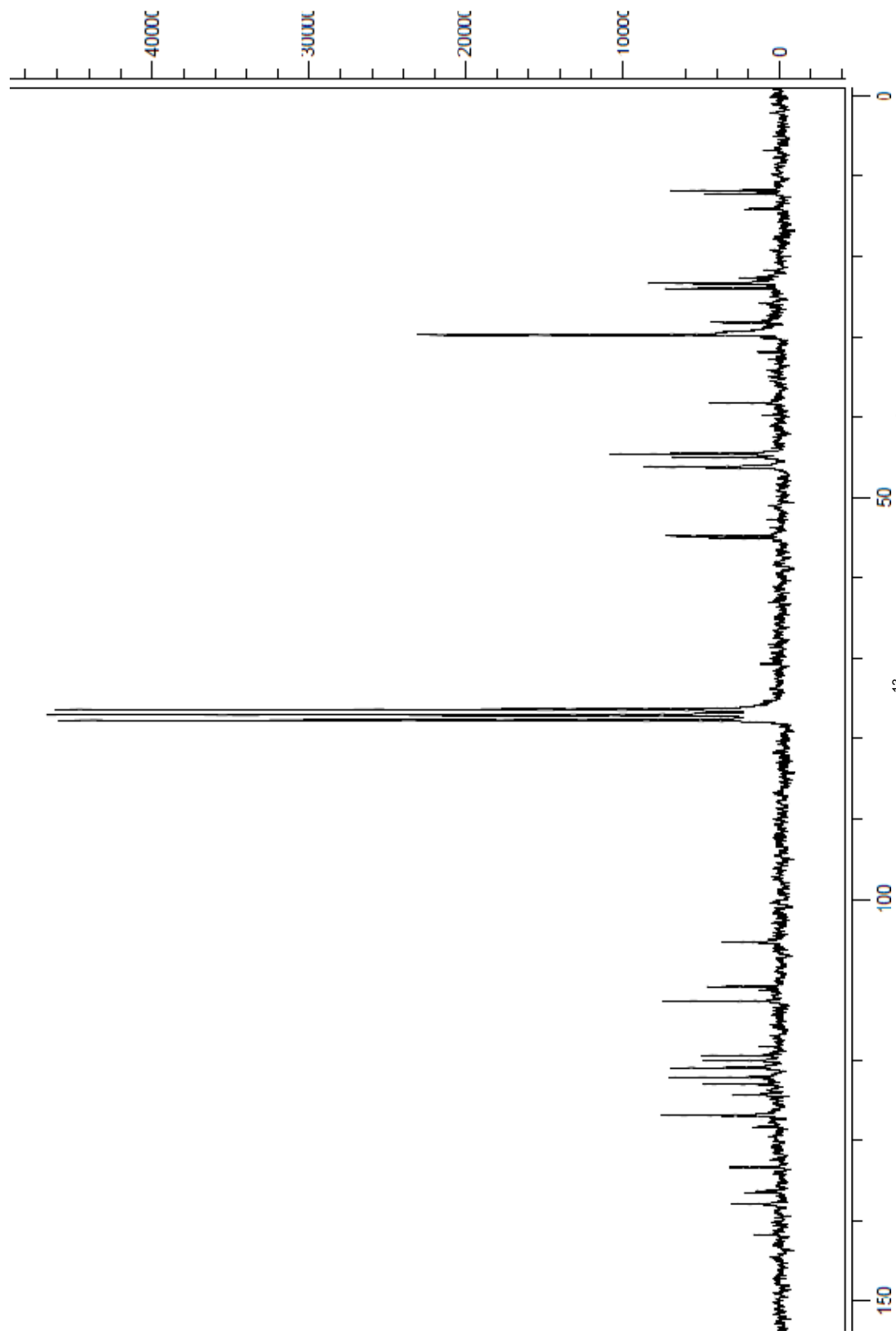
Tabela 3. Dados do espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 200 MHz) de HLB, em comparação com dados da *epi*-uleína e uleína descritos na literatura (δ ppm, multiplicidade, constante de acoplamento *J*).

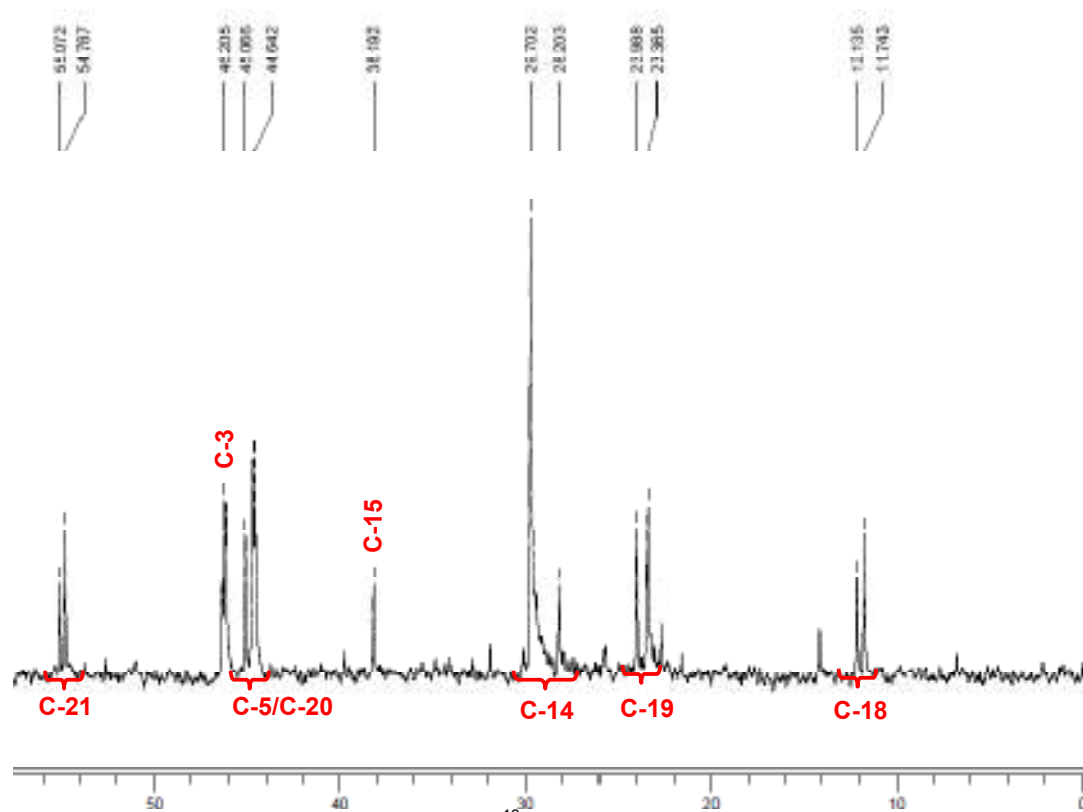
H	HLB	<i>epi</i> -uleína ^a	<i>epi</i> -uleína ^b	uleína ^c
H-3	2,49 (<i>m</i>)	2,4 (H, <i>m</i>)	-	2,09-2,06 (H-3b, <i>m</i>)
H-3	2,62 (<i>m</i>)	2,65 (H, <i>m</i>)	-	2,46-2,48 (H-3a, <i>m</i> , <i>J</i> = 2,5 e 8,2 Hz)
H-5	2,25 (<i>s</i>)	2,25 (3H, <i>s</i>)	2,28 (3H, <i>s</i>)	2,29 (<i>s</i>)
H-9	7,38 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,30 (H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)	7,0 - 7,70 (4H, <i>m</i>)	7,56 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
H-10	7,10 (<i>d</i>)	7,10 (H, <i>t</i>)	7,0 - 7,70 (4H, <i>m</i>)	7,10 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)
H-11	7,18 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	7,15 (H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	7,0 - 7,70 (4H, <i>m</i>)	7,19 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)
H-12	7,49 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,9 Hz)	7,55 (H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	7,0 - 7,70 (4H, <i>m</i>)	7,35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
H-14	2,00 (<i>m</i>)	2,00 (2H, <i>m</i>)	-	1,66-1,72 (H-14b, <i>m</i>) 2,09-2,06 (H-14a, <i>m</i>)
H-15	-	-	-	2,09-2,06 (<i>m</i>)
H-17	4,98 (<i>s</i>)	4,95 (H, <i>s</i>)	4,96 (H, <i>s</i>)	4,98 (<i>s</i>)
H-17	5,25 (<i>s</i>)	5,20 (H, <i>s</i>)	5,24 (H, <i>s</i>)	5,26 (<i>s</i>)
H-18	1,01 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)	1,08 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)	1,0 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6 Hz)	0,85 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)
H-19	1,25 (<i>s</i>)	1,25 (2H, <i>t</i>)	-	1,12 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7,4 Hz)
H-20	-	-	-	2,68 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,8 Hz)
H-21	4,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,25 Hz)	4,00 (H, <i>s</i>)	4,10 (H, br <i>s</i>)	4,09 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,5 Hz)
NH	8,53 (br <i>s</i>)	8,25 (NH, <i>s</i>)	8,62 (NH, br <i>s</i>)	8,28 (br <i>s</i>)

a. Jácome et al., 2004 (CDCl₃, 360 MHz)

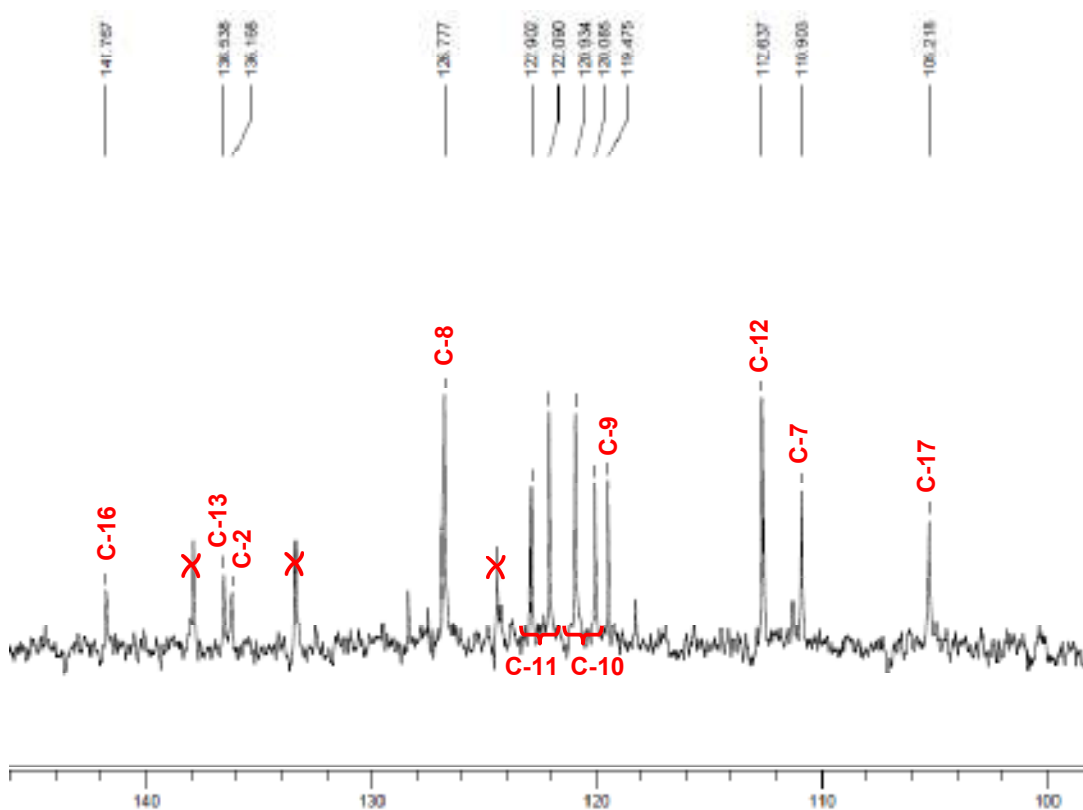
b. Borris et al., 1983 (CDCl₃, 60 MHz)

c. Lopes, 2008 (CDCl₃, 600 MHz). Dados não publicados.





Espectro 15. Expansão do espectro de RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) na região entre δ 0 a 60 ppm de HLB (δ ppm).



Espectro 16. Expansão do espectro de RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) na região entre δ 100 a 150 ppm de HLB (δ ppm).

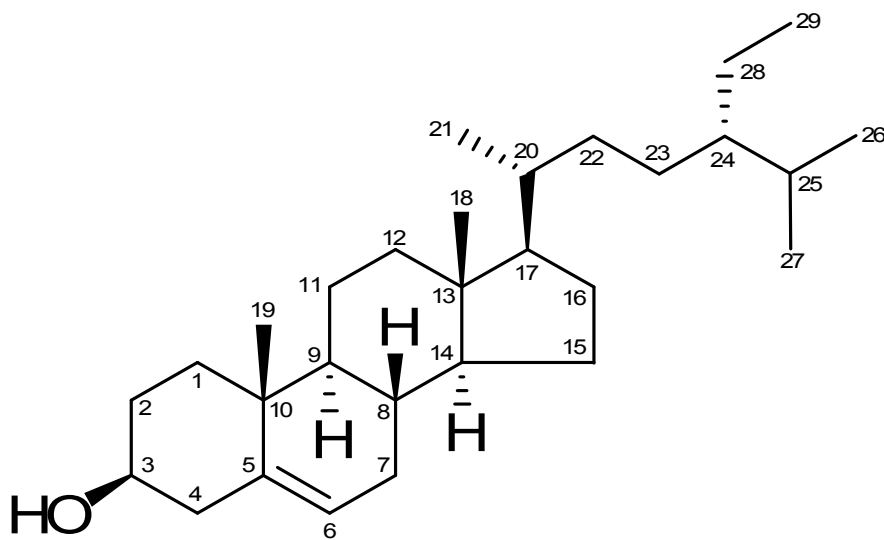
Tabela 4. Dados do espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 52 MHz) de HLB, em comparação com dados da *epi*-uleína e uleína descritos na literatura (δ ppm). *sinal mais provável.

C	HLB	<i>epi</i>-uleína^a	<i>epi</i>-uleína^b	uleína^c
C-2	136,2	136,5	136,4	135,2
C-3	46,2	46,4	46,2	46,2
C-5	44,6 / 45,1*	44,8	44,4	44,3
C-7	110,9	110,8	110,0	107,7
C-8	126,8	128,5	127,9	129,4
C-9	119,5	119,6	119,0	119,5
C-10	120,1* / 120,9	119,9	119,8	119,9
C-11	122,1/ 122,9*	122,8	122,6	122,7
C-12	112,6	111,9	111,0	110,7
C-13	136,5	135,9	136,6	136,6
C-14	28,2* / 29,7	28,5	27,8	34,7
C-15	38,2	38,5	37,7	39,5
C-16	141,8	142,1	141,1	138,7
C-17	105,2	104,7	106,1	106,8
C-18	12,1* / 11,7	12,2	12,0	11,8
C-19	23,4* / 24,00	23,5	23,3	24,4
C-20	44,6* / 45,1	44,7	44,2	46,1
C-21	54,8* / 55,1	54,9	55,3	56,6

- a. Jácome et al., 2004 (CDCl₃, 90 MHz)
 b. Borris et al., 1983 (CDCl₃, 22,68 MHz)
 c. Lopes, 2008 (CDCl₃, 150 MHz). Dados não publicados.

4.2.3. HLC – β -sitosterol

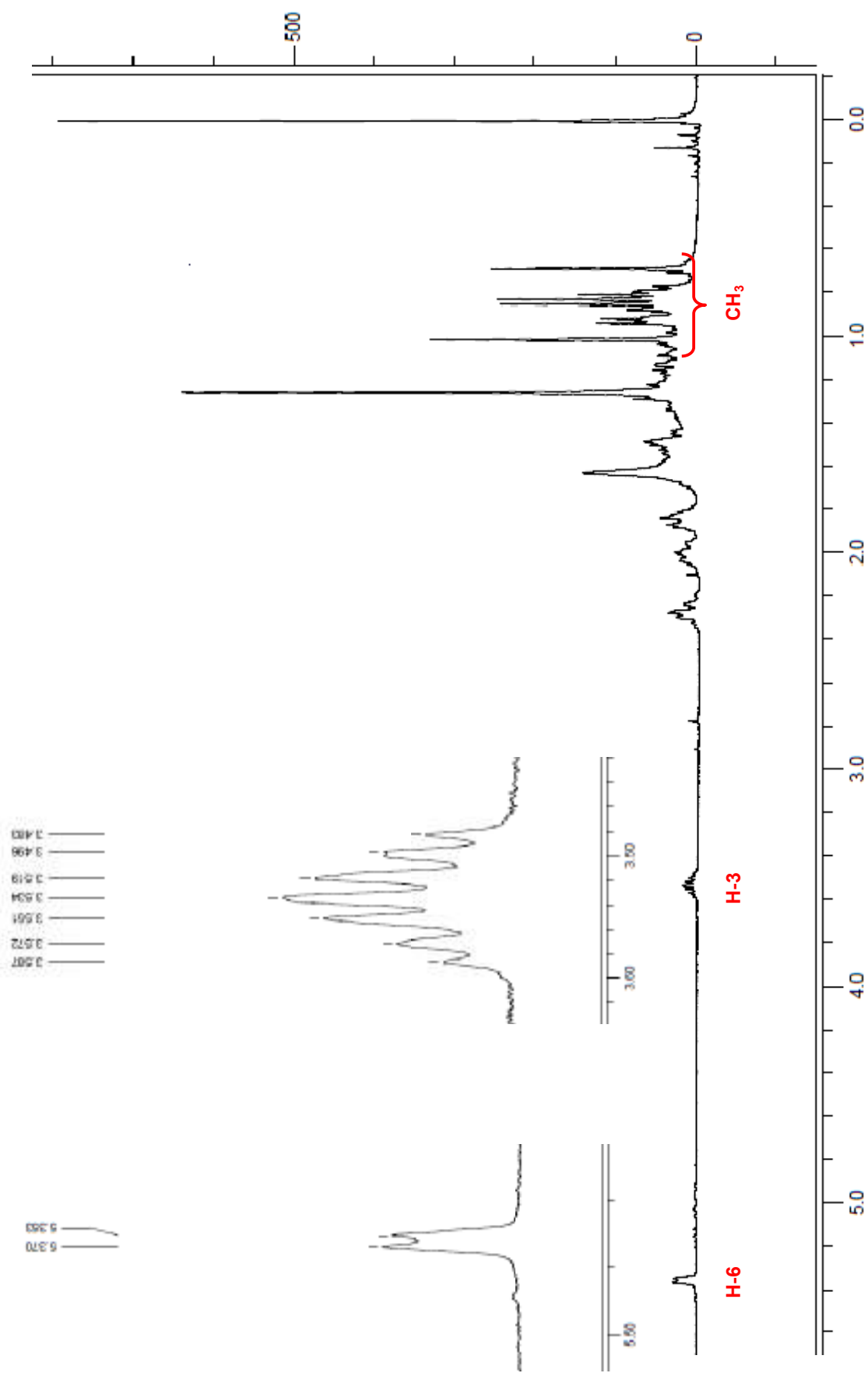
O composto HLC foi isolado na forma de cristais esbranquiçados, solúveis em CHCl_3 ou CH_2Cl_2 , e não apresentou absorção no UV. Análises espectroscópicas evidenciaram que HLC corresponde ao esteroide β -sitosterol (XXVIII). O β -sitosterol é provavelmente o fitoesteroide mais abundante e amplamente distribuído nas plantas. Este esteroide contém um grupo β -etila no C-24 do esqueleto do colesterol, o que o torna mais lipofílico (Awad; Fink, 2000; Fierro et al., 2004), e por isso é classificado como um derivado C-24-etil do colesterol (Dewick, 2002).



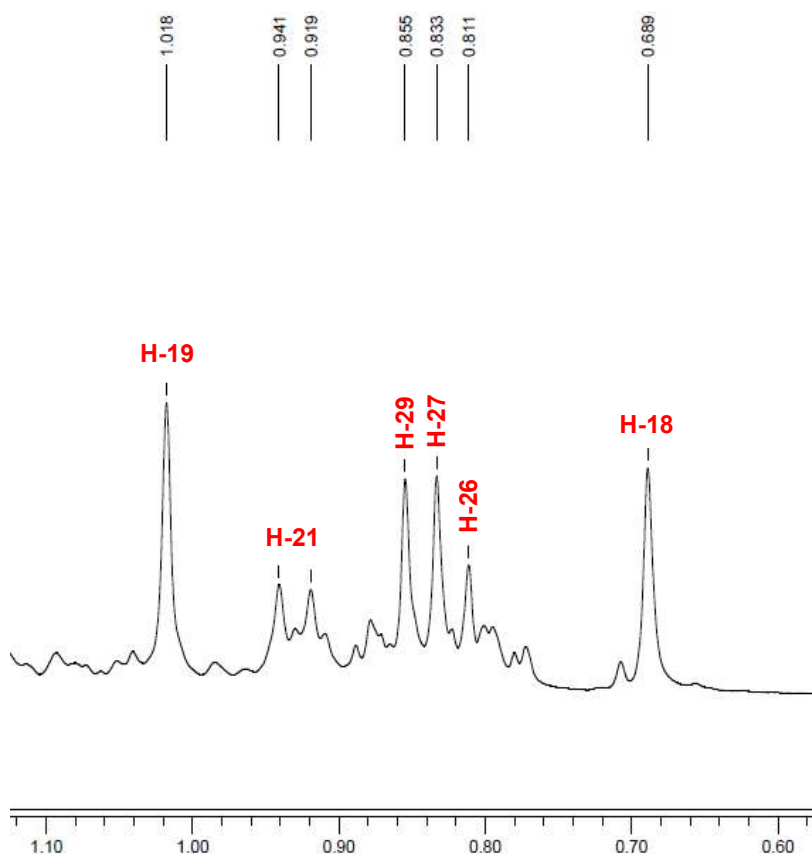
XXVIII

Os espectros de RMN- ^1H e ^{13}C confirmaram o perfil de uma estrutura esteroidal, com sinais semelhantes aos já descritos na literatura para o β -sitosterol (Núñez, 1996; Kovganko et al., 1999; Barbosa-Filho et al., 2004; Maldaner, 2005; Habib et al., 2007; Dalmarco, 2009; Gohari et al., 2009).

No espectro de RMN- ^1H de HLC (Espectros 17 e 18), foram observados sinais característicos de compostos esteroidais, descritos a seguir: δ 5,35 (1H, *d*, H-6); 3,53 (1H, *m*, H-3); 1,01 (3H, *s*, H-19); 0,91 (3H, *d*, $J= 6,5$ Hz, H-21); 0,85 (3H, *s*, H-29); 0,83 (3H, *s*, H-27); 0,81 (3H, *s*, H-26); 0,68 (3H, *s*, H-18); 1,26-2,29 (*m*, outros hidrogênios).



Espectro 17. Espectro de RMN-¹H de HLC, com suas respectivas expansões (300 MHz, CDCl₃; δ ppm).



Espectro 18. Expansão do espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) da região alifática (δ 1,10 a 0,60 ppm) de HLC (δ ppm).

O dupletto sinalizado em δ 5,35 corresponde a um hidrogênio olefínico ligado a carbono sp^2 , indicando a presença de uma ligação dupla endocíclica em C-6. A presença do multipletto centrado em δ 3,53, referente ao hidrogênio ligado ao C-3, sugere a presença de um hidrogênio carbinólico típico da β -hidroxilação do sistema ciclopentanoperidrofenantreno no mesmo carbono, característico dos fitoesteróis. Além do mais, o grupo de sinais que absorvem na região de δ 0,7-2,4 é típico de estruturas esteroidais. A presença de um singletto em δ 0,68 referente aos hidrogênios do grupo metílico do C-18, de vários sinais entre δ 0,7-1,0 de grupos metílicos e entre δ 1,0-2,0 de grupos metilênicos, reforça o indício da estrutura tratar-se do β -sitosterol.

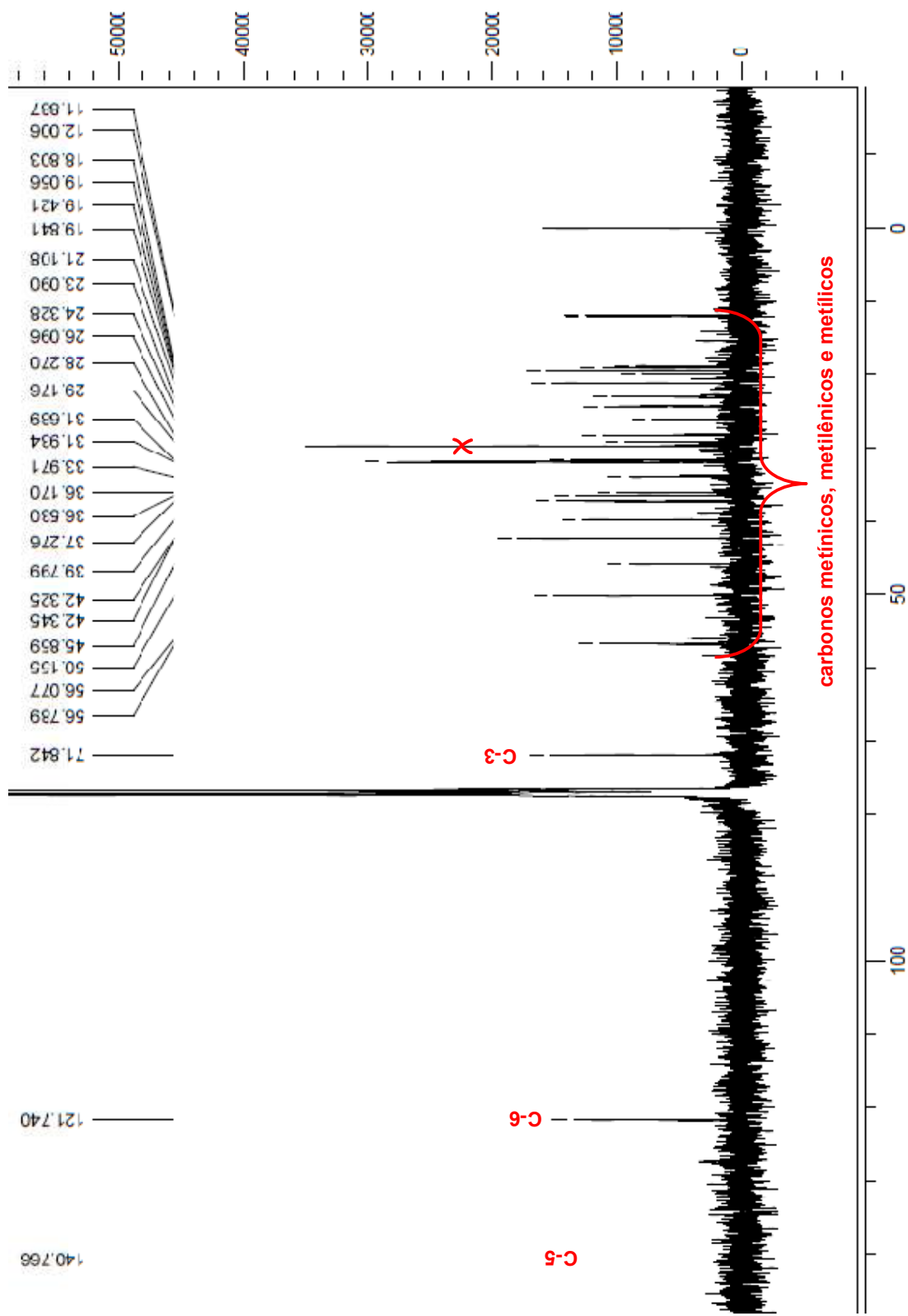
No espectro de RMN-¹³C (Espectro 19) foi possível observar 29 sinais de carbonos, conforme pode ser observado na Tabela 5, descartando a possibilidade de tratar-se de um triterpeno, evidenciando assim um esteroide. Foi verificada a presença de dois sinais, em δ 140,76 e δ 121,74, correspondentes aos carbonos olefínicos da ligação dupla endocíclica C-5—C-6, e um sinal em δ 71,84, correspondente ao carbono C-3 ligado a uma hidroxila (carbono carbinólico). Os

sinais entre δ 56,78 e δ 11,88 são atribuídos aos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos da molécula.

Tabela 5. Dados do espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de HLC, em comparação com dados da literatura. (δ ppm).

C	HLC	β-sitosterol^a	β-sitosterol^b	β-sitosterol^c	β-sitosterol^d
C-1	37,3	37,3	37,5	37,2	37,3
C-2	31,7	31,5	31,9	31,6	31,6
C-3	71,8	71,8	72,0	71,8	71,8
C-4	42,3	42,3	42,5	43,2	42,3
C-5	140,8	140,8	141,00	140,7	140,8
C-6	121,7	121,7	121,9	121,7	121,7
C-7	31,9	31,9	32,1	31,9	32,1
C-8	31,7	31,7	32,1	31,9	32,1
C-9	50,2	50,1	50,3	50,1	50,2
C-10	36,5	36,5	36,7	36,5	36,5
C-11	21,1	21,1	21,3	21,1	21,1
C-12	39,8	39,8	40,00	39,8	39,8
C-13	42,3	42,3	42,5	42,3	42,3
C-14	56,8	56,8	57,00	56,8	56,8
C-15	24,3	24,3	24,5	24,3	24,3
C-16	28,3	28,2	28,5	28,2	28,3
C-17	56,1	56,1	56,3	56,0	56,1
C-18	11,9	11,8	12,2	11,8	12,0
C-19	18,8	18,8	20,00	18,8	19,1
C-20	36,2	36,1	36,4	36,1	36,2
C-21	19,0	19,0	19,0	19,0	18,8
C-22	34,00	34,0	34,2	33,9	34,0
C-23	26,1	26,1	26,3	26,1	26,2
C-24	45,8	45,9	46,0	45,8	45,2
C-25	29,2	29,2	29,4	29,1	29,2
C-26	19,8	19,8	19,6	19,8	18,9
C-27	19,4	19,4	19,2	19,4	19,1
C-28	23,1	23,1	23,3	23,0	23,1
C-29	12,00	12,0	12,1	12,00	11,9

- a. Maldaner, 2005 (CDCl_3 , 100 MHz)
 b. Dalmarco, 2009 (CDCl_3 , 100 MHz)
 c. Barbosa-Filho et al., 2004 (CDCl_3 , 50 MHz)
 d. Kovganko et al., 1999 (CDCl_3 , 90 MHz)



Espectro 19. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de HLC (δ ppm).

4.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESERPINA EM CASCAS CAULINARES DE *R. sellowii*

4.3.1. Otimização do método analítico

Após reprodução prévia dos métodos citados na Seção 3.4.4, o método selecionado foi originalmente desenvolvido e validado por Dhooghe e colaboradores (2008) para a determinação do alcaloide indólico estrictosamida no extrato das cascas caulinares de *Nauclea pobeguini* (Rubiaceae), utilizando ajmalicina como padrão interno. O método consistia de um gradiente (0 min, 80:20 (A:B); 5 min, 80:20; 20 min, 60:40; 25 min, 0:100) utilizando 0,2% de dietilamina e 0,16% de ácido fórmico em H₂O como solvente A e 0,2% de dietilamina e 0,16% de ácido fórmico em acetonitrila como solvente B. A coluna utilizada foi uma GraceSmart RP18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), com um fluxo de 1,0 ml/min e os picos foram detectados a 226 nm.

Para a otimização das condições cromatográficas, vários sistemas de eluição gradiente, concentração da fase orgânica, pH da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna foram testados. De acordo com monografias oficiais (British Pharmacopoeia, 2007; USP30-NF25, 2007) e em dados do espectro de UV, a reserpina possui duas bandas com um máximo de absorvância em 222 nm, porém apresenta maior seletividade em 268 nm, que foi o comprimento de onda selecionado para o método. Os cromatogramas do padrão de reserpina e do extrato mostraram picos com boa resolução a 268 nm.

Para a quantificação de reserpina em cascas caulinares de *R. sellowii*, o método desenvolvido por Dhooghe e colaboradores (2008) foi reproduzido inicialmente em cromatógrafo líquido Varian Pro-Star, bomba 230, autoamostrador 410 e detector PDA 335 em uma coluna Varian Microsorb – MV 100 RP18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), utilizando-se uma solução do padrão de reserpina a 50,0 µg/ml e de extrato a 200,0 µg/ml. Em virtude do elevado tempo de corrida para a eluição dos picos cromatográficos no extrato, em torno de 45 minutos (Figura 67), o método foi adaptado, otimizando-se as condições experimentais.

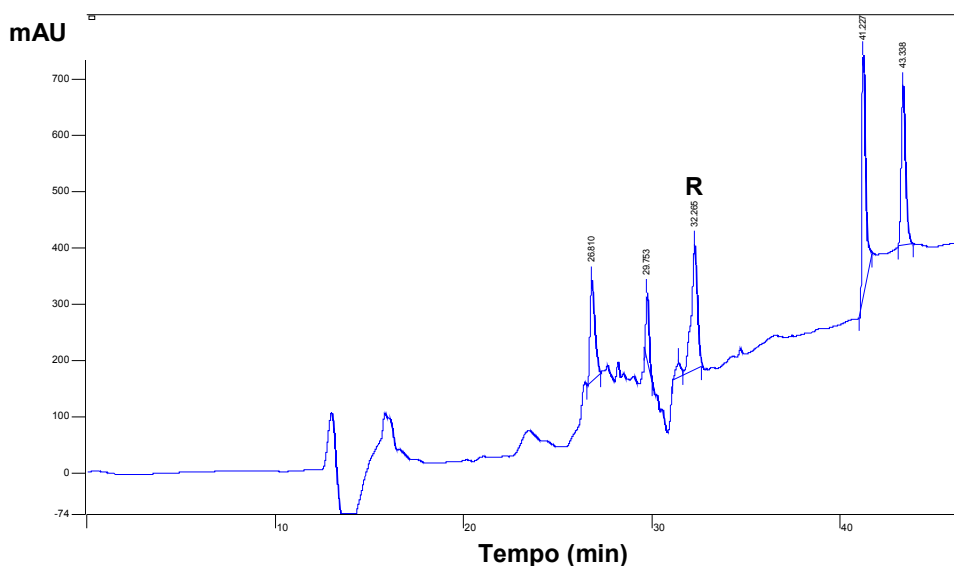


Figura 67. Cromatograma do extrato de *Rauwolfia sellowii* (200,0 µg/ml; volume de injeção= 100 µl), utilizando as condições originais do método descrito por Dhooche e colaboradores (2008). Tempo de retenção da reserpina **R**= 32,26 min.

A otimização do método foi iniciada aumentando-se a concentração da fase orgânica para 30% em 10 minutos, uma vez que o analito possuía uma afinidade elevada com a fase estacionária RP18 e permanecia retido na coluna, assim como outras substâncias do extrato. O método alterado foi o seguinte: 0 min, 80:20 (A:B); 10 min, 70:30; 20 min, 60:40; 25 min, 0:100; 40 min, 0:100, com fluxo de 1,0 ml/min, detecção em 268 nm, pH da fase aquosa 3,6, mantendo-se as fases móveis originais. O tempo de retenção da reserpina foi de 26,67 minutos (Figura 68).

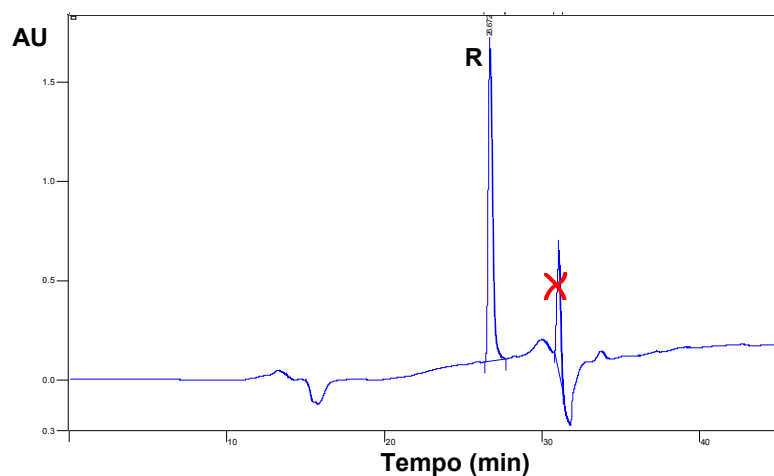


Figura 68. Cromatograma do padrão de reserpina **R** (50,0 µg/ml; volume de injeção= 100 µl), apresentando tempo de retenção de 26,67 min.

Posteriormente, avaliou-se a influência da concentração de dietilamina e ácido fórmico (0,1%; 0,15% e 0,2%) na fase móvel e foi observado que não houve diferenças consideráveis entre as concentrações. Portanto, optou-se pela menor proporção destes reagentes (0,1%), uma vez que, segundo Hutabarat e colaboradores (1998), possíveis danos à coluna podem ser evitados reduzindo-se a concentração de ácido da fase móvel. Dos valores de pH testados (pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0), o pH ótimo definido foi igual a 5,0, onde o pico da reserpina apresentou discretamente uma melhor resolução.

A temperatura da coluna é outra variável importante devido a sua influência na estabilidade dos analitos (Muñoz et al., 2008). As temperaturas de 25, 30, 35 e 40° C foram avaliadas, não exercendo influências significativas na resolução dos picos, optando-se assim pela temperatura ambiente. O fluxo também foi avaliado (0,8 a 1,2 ml/min), mantendo-se o fluxo original. Fluxos maiores que 1,0 ml/min apresentaram co-eluição entre os picos, enquanto que fluxos menores provocaram ligeiro alargamento dos picos.

Por questões de estabilidade da coluna, a proporção inicial de fase orgânica (20%) foi retomada ao final da corrida, permitindo o acondicionamento desta para a próxima análise. O método parcial otimizado manteve um gradiente (0 min, 80:20 (A:B); 10 min, 70:30; 20 min, 60:40; 25 min, 0:100; 30 min, 0:100; 35 min, 80:20; 40 min, 80:20), utilizando 0,1% de dietilamina e 0,1% de ácido fórmico em H₂O como solvente A e 0,1% de dietilamina e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila como solvente B, com fluxo de 1,0 ml/min, detecção em 268 nm, pH da fase aquosa igual a 5,0 (ajustado com NH₄OH e H₃PO₄) e temperatura da coluna de 25° C (Figura 69).

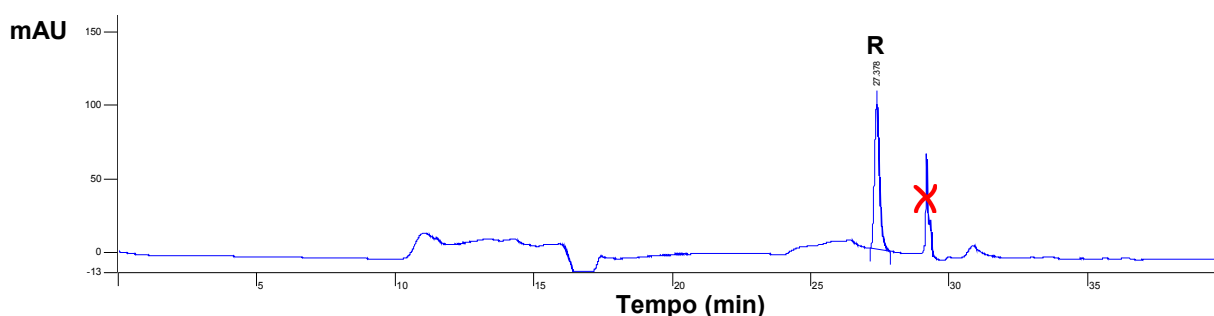


Figura 69. Cromatograma do padrão de reserpina **R** (50,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl), apresentando tempo de retenção de 27,38 min.

Como tempos de corrida elevados não são viáveis para análises rotineiras de controle de qualidade, foram propostas alterações adicionais relacionadas

basicamente à concentração da fase orgânica no gradiente. Observou-se que quando a concentração da fase orgânica aproximava-se de 100%, a reserpina era detectada pelo DAD, indicando que sua retenção na coluna era determinada pela acetonitrila. A reserpina é um alcaloide indólico monoterpênico, portanto possui baixa polaridade e alta afinidade por cadeias hidrofóbicas, como é o caso dos grupamentos C-18 da coluna em fase reversa, em virtude do ácido trimetoxicinâmico presente na molécula. Aumentou-se a concentração de acetonitrila para 100% em diferentes tempos para adiantar a sua eluição, facilitando sua remoção da coluna e diminuindo o tempo de corrida. A concentração da fase aquosa inicial foi reduzida a 50% a fim de eluir uma maior gama de compostos, sobretudo os de média polaridade que poderiam interferir na eluição do analito. Nesta etapa, foi utilizado o equipamento nas condições descritas na seção 3.4.3.

A dietilamina disponível continha inúmeros contaminantes que interferiram na análise. Desta forma, substituiu-se a dietilamina pela trietilamina, que além de estar isenta de contaminantes, conferiu maior resolução aos picos.

A boa separação da reserpina no extrato ocorreu em menos de 10 minutos com um sistema em gradiente usando como fase móvel H₂O (pH 5,0) e acetonitrila, ambos contendo ácido fórmico e trietilamina (0,1% de cada). A proporção de 100% de acetonitrila ocorreu em 6,10 minutos e manteve-se até 7 minutos, sendo que a reserpina eluiu em 7,55 minutos (Figura 70).

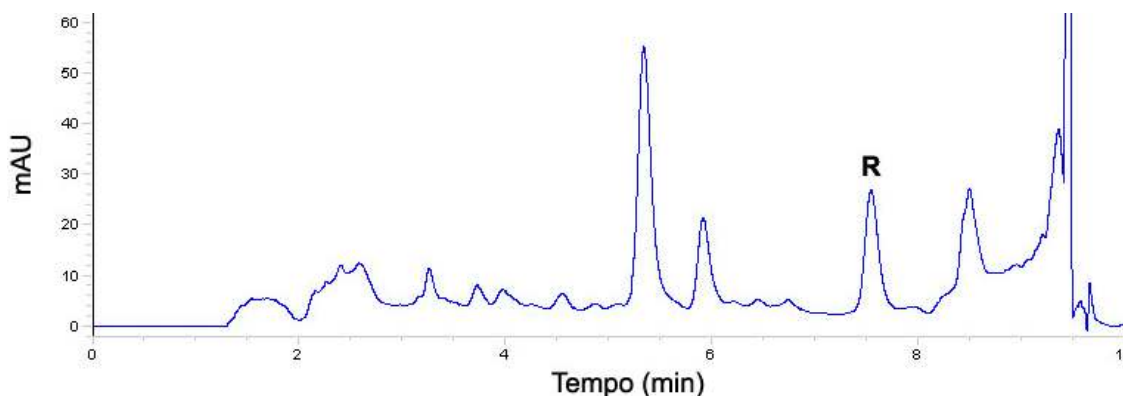


Figura 70. Cromatograma do extrato de *Rauvolfia sellowii* (1000,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl), utilizando o método otimizado final. Tempo de retenção da reserpina **R**= 7,55 min.

O método final, com todas as suas especificações, pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Especificações do método otimizado final para quantificação de reserpina em cascas caulinares de *Rauvolfia sellowii*.

Parâmetros		Especificações	
Fase móvel		(A) 0,1% de trietilamina e 0,1% de ácido fórmico em H ₂ O (pH= 5,0, corrigido com NH ₄ OH e H ₃ PO ₄)	(B) 0,1% de trietilamina e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila
GRADIENTE	Tempo (min)	A (%)	B (%)
	0 – 3,0	50	50
	3,0 - 3,10	45	55
	3,10 – 6,0	45	55
	6,0 - 6,10	0	100
	6,10 – 7,0	0	100
	7,0 – 7,10	50	50
	7,10 – 10,0	50	50
Coluna	Waters Spherisorb® (RP18 ODS2, 250 x 4,6 mm, 5 µm)		
Fluxo	1,0 ml/min		
Temperatura	25° C		
λ	268 nm		
Volume de injeção	20 µl		

Os maiores desafios no desenvolvimento de um novo método quantitativo para a análise de plantas medicinais incluem a quantidade desconhecida da molécula de interesse na amostra, a qual depende de uma completa extração; a alta variabilidade de conteúdo devido a influências de circunstâncias de crescimento, época de coleta e armazenamento do material vegetal, entre outras; e a falta de substâncias de referência disponíveis comercialmente (Theunis et al., 2007).

Uma das técnicas mais efetivas para a análise qualitativa e quantitativa de alcaloides em drogas vegetais é a CLAE devido ao seu alto poder de resolução e automatização (Stöckigt et al., 2002). Ela constitui-se em uma excelente técnica para a quantificação de alcaloides indólicos, facilitada pela forte absorção do núcleo

indólico na região do ultravioleta, o que torna esse método bastante sensível (Schripsema et al., 2004).

Antes de iniciar o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a quantificação de um analito em determinada matéria-prima vegetal, é de fundamental importância a preparação de um extrato que concentre o princípio ativo ou grupo de compostos de interesse. Esse processo envolve a análise de fatores que influenciam diretamente na extração das substâncias de uma planta, os quais variam de acordo com a espécie vegetal, com a parte da planta utilizada e das propriedades das moléculas alvo. Esses fatores incluem estabilização e secagem, moagem, relação droga/solvente, processo de extração, entre outros, e eles devem ser criteriosamente estabelecidos a fim de garantir a padronização de extratos, assegurando uma maior concentração dos compostos de interesse (Falkenberg et al., 2004).

Em geral, para determinar a quantidade de um composto ativo ou marcador químico presente em um extrato bruto ou em um produto derivado por meio de uma técnica cromatográfica como CLAE, é necessário usar um material de referência que serve como padrão externo (Dhooghe et al., 2008). Segundo Ribani e colaboradores (2004), o método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas de soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.

Para a análise do extrato de *R. sellowii*, a substância padrão de escolha, com pureza conhecida, foi a reserpina. A reserpina, apesar de não ser o composto majoritário do extrato, é de fácil acesso e comercializado a um custo relativamente barato quando comparado a outros padrões de alcaloides indólicos, como a ajmalicina e a ioimbina. Além do mais, a reserpina pode ser considerada como um marcador do gênero *Rauvolfia*, uma vez que é encontrada em praticamente todas as espécies do gênero, notadamente nas brasileiras (Carlos, 2007).

O método otimizado consistiu de um gradiente, contendo 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de trietilamina em H₂O (pH 5,0) e em acetonitrila como fases móveis. Um sistema gradiente foi escolhido por causa da complexidade da matriz. De acordo com de Souza e colaboradores (2002), a coeluição de substâncias absorvidas pela coluna é um problema frequente na análise de misturas complexas por CLAE, como é o caso de extratos vegetais. Isto é devido à influência negativa da saturação da coluna cromatográfica por substâncias não polares. Para limpar a coluna e o detector e reduzir esta influência negativa, um método gradiente é uma boa escolha.

O método descrito neste trabalho foi otimizado utilizando-se concentração alta de solvente orgânico na fase móvel para eluir tanto o analito quanto outras substâncias, antes de retornar às condições iniciais. Por outro lado, conforme Hutabarat e colaboradores (1998), o principal inconveniente de sistemas gradientes é que mudanças dramáticas na concentração da fase móvel, associadas com as alterações de pressão, podem afetar a coluna adversamente e reduzir sua vida útil.

Segundo Dhooghe e colaboradores (2008), com relação aos aditivos presentes na fase móvel, a presença do ácido fórmico evita a ionização de grupos hidroxila, enquanto a dietilamina ou a trietilamina conseguem mascarar grupos ionizados remanescentes. A presença do ácido fórmico e da trietilamina também na fase orgânica, mantêm sua concentração equivalente durante toda a corrida analítica. De acordo com César e colaboradores (2006), a acidificação de ambas as fases, aquosa e orgânica, promove a supressão da ionização e conseqüentemente melhora a simetria do pico, evitando caudas derivadas da retenção de substâncias básicas com grupos silanol da fase estacionária.

Foi utilizada uma coluna em fase reversa C-18 (RP-18) para a análise cromatográfica. De acordo com Stöckigt e colaboradores (2002), a cromatografia líquida em fase reversa (RP) é a principal ferramenta para a análise de produtos naturais e especialmente de alcaloides. A vantagem mais atrativa da cromatografia em RP é a capacidade de determinar simultaneamente uma variedade enorme de compostos que diferem marcadamente em estrutura molecular, massa molecular, polaridade e acidez/basicidade.

Ainda segundo Stöckigt e colaboradores (2002), a maioria das fases móveis que são utilizadas em uma coluna RP-18 possuem um valor de pH baixo, geralmente menor que 3, onde os grupos silanol estão totalmente protonados. Por outro lado, valores de pH abaixo de 2,5 podem acarretar sérios problemas à fase estacionária em RP-18. Além disso, o uso de colunas RP-18 ajuda a suprimir mecanismos de retenção indesejados. Nesse tipo de coluna, parte dos grupos silanol estão bloqueados, o que pode efetivamente minimizar a interação iônica entre grupos silanois desprotonados e analitos catiônicos, mas também reduz a interação polar que pode melhorar a seletividade. Além do mais, um material RP-18 fornece uma maior afinidade para estruturas lipofílicas, tais como esqueletos carbônicos de alcaloides indólicos monoterpênicos.

O método otimizado, descrito neste estudo, é mais rápido que o original, tem um custo baixo para análises de rotina e o valor de pH da fase móvel não é

agressivo para a fase estacionária. Isto não descarta possibilidades para melhoras adicionais no método, com vista a encontrar condições adequadas à separação do analito investigado. Além do mais, este método pode ser adaptado para a análise da reserpina em outras espécies de *Rauvolfia*, determinando assim parâmetros quali e quantitativos para este marcador, contribuindo para a garantia da qualidade destas matérias-primas vegetais.

4.3.2. Validação do método analítico

4.3.2.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade do método foi determinada comparando-se o perfil cromatográfico e os dados obtidos do padrão de reserpina e do extrato de *R. sellowii*, considerando os seguintes parâmetros: tempo de retenção, resolução e espectro de UV. A resolução do pico da solução padrão de reserpina (10,0 µg/ml) comparada ao pico da amostra (1000,0 µg/ml), após análise dos cromatogramas obtidos por DAD, evidenciou a especificidade do método. Em virtude da baixa concentração do analito na amostra, foi necessário aumentar sua concentração no extrato, adicionando-se reserpina (co-cromatografia), a fim de garantir que o tempo de retenção correto estava sendo determinado. Os perfis cromatográficos do extrato das cascas caulinares de *R. sellowii* e do padrão de reserpina, analisados sob as condições preconizadas no método analítico (Tabela 6), podem ser observados nas Figuras 70 e 71, respectivamente.

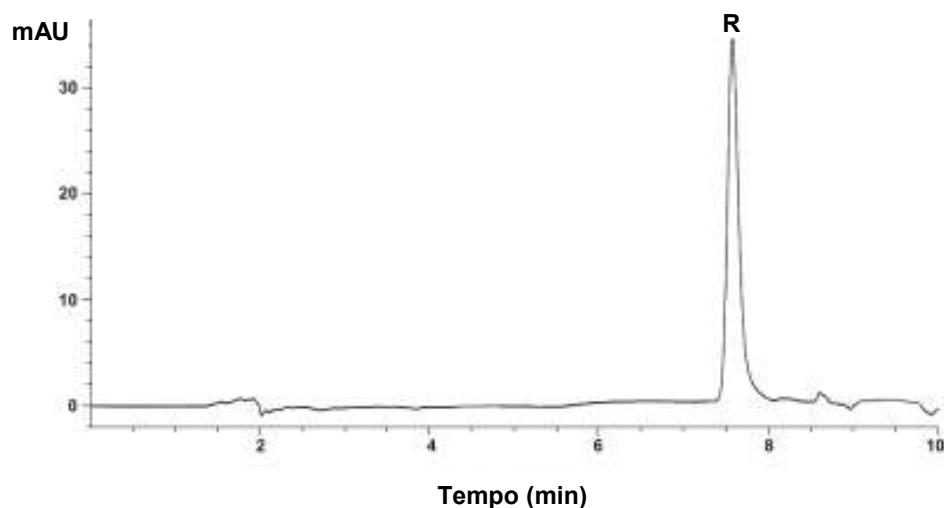


Figura 71. Cromatograma do padrão de reserpina (10,0 µg/ml; volume de injeção= 20 µl) a 268 nm de acordo com o método preconizado. Tempo de retenção da reserpina **R**= 7,58 min.

A avaliação do extrato de *R. sellowii* por DAD foi indispensável, pois através desta fonte o espectro de UV do pico com tempo de retenção em 7,55 minutos pôde ser observado. Comparando-se os espectros obtidos, observou-se que a reserpina apresenta duas bandas (A e B) com máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) na mesma faixa do comprimento de onda, entre 220 e 268 nm. O mesmo perfil foi observado no padrão de referência (Figura 72).

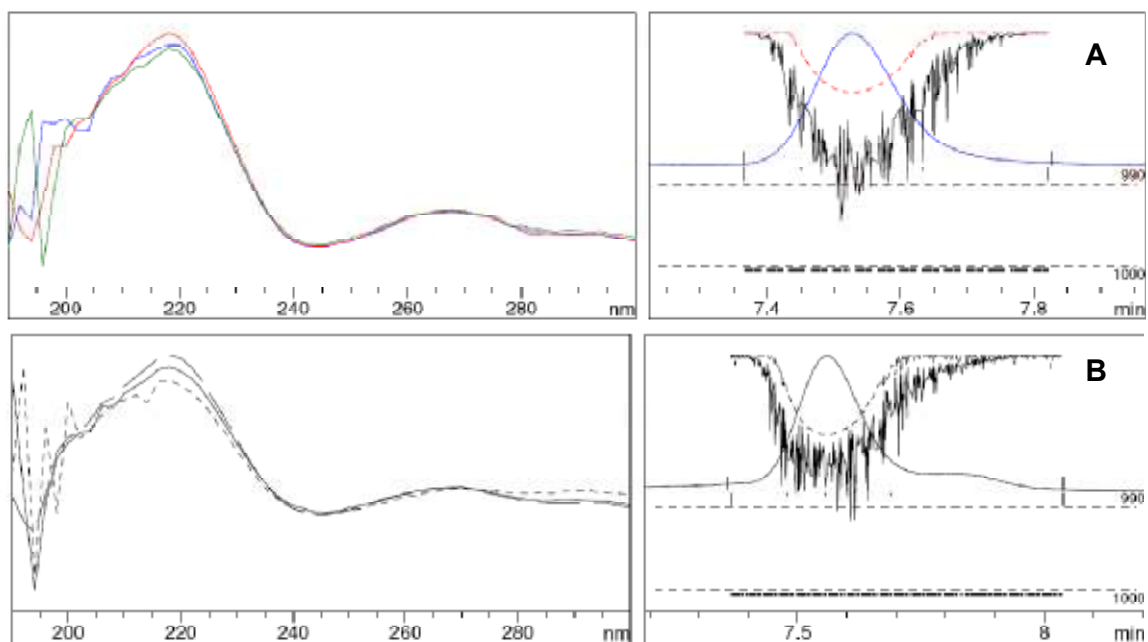


Figura 72. Perfil espectral de UV e pureza de pico da reserpina. **A.** padrão de referência. **B.** reserpina no extrato de *Rauvolfia sellowii*.

Através da análise por CLAE com DAD foi possível verificar que o grau de pureza do pico referente à reserpina no extrato era satisfatório, em concordância com o composto de elevada pureza espectral, confirmando a ausência de impurezas, assegurando que o método desenvolvido é adequado para a análise deste analito em cascas de *R. sellowii*. Picos são considerados puros quando há uma coincidência entre os três espectros referentes ao início (*upslope*), ápice (*apex*) e descida do pico (*downslope*) (Govindarajan et al., 2007).

A seletividade do método foi considerada satisfatória, com pureza de pico adequada. De acordo com Ribani e colaboradores (2004), a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do analito. Nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Outra indicação do

composto puro é a análise do pico com detectores modernos, como DAD, que comparam o espectro do composto obtido na separação com o de um padrão de referência.

4.3.2.2. Linearidade e Intervalo

Para a construção da curva de calibração foram utilizadas soluções de reserpina na faixa de concentração de 0,625 a 40,0 $\mu\text{g/ml}$. A Tabela 7 apresenta uma média das três curvas de calibração construídas, relacionando as áreas dos picos correspondentes às diferentes concentrações de reserpina (Figura 73).

Tabela 7. Áreas dos picos da reserpina em diferentes concentrações obtidas pela média de três curvas de calibração por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$) \pm DP	Área sob a curva (mAU) \pm DP
0,625	0,643 \pm 0,0130	19,511 \pm 0,206
1,25	1,287 \pm 0,00945	41,122 \pm 0,782
2,5	2,573 \pm 0,0159	75,225 \pm 0,859
5,0	5,163 \pm 0,00850	149,030 \pm 1,457
10,0	10,293 \pm 0,0170	314,450 \pm 1,081
20,0	20,585 \pm 0,0134	625,070 \pm 0,725
40,0	41,171 \pm 0,0771	1269,600 \pm 0,843

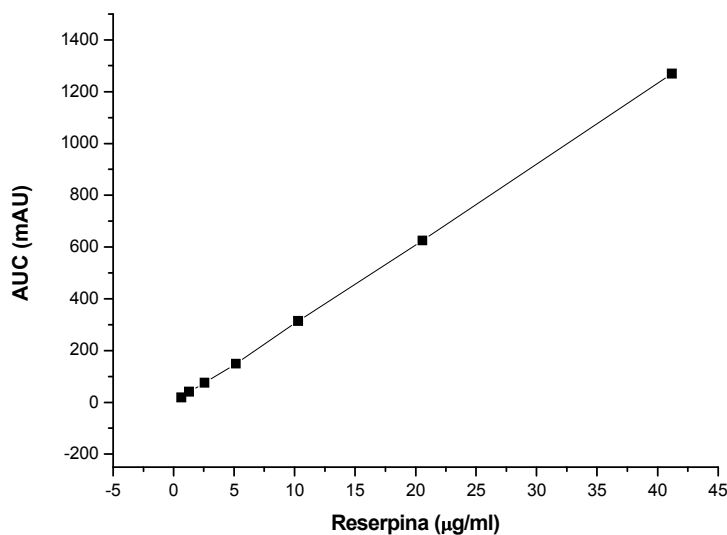


Figura 73. Curva de calibração da reserpina (0,625-40,0 $\mu\text{g/ml}$).

A análise de regressão linear demonstrou que a resposta do padrão de reserpina no intervalo de concentração avaliado foi linear. A equação da reta obtida foi $y = 30,84x - 3,78$, considerando-se um $n = 7$ e $r^2 = 0,9999$. A Tabela 8 apresenta os parâmetros calculados para os dados da curva de reserpina obtidos por regressão linear.

Tabela 8. Parâmetros de calibração da curva de reserpina.

Parâmetros	Resultados da análise
Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)	0,625 – 40,0
Limite de detecção ($\mu\text{g/ml}$)	0,272
Limite de quantificação ($\mu\text{g/ml}$)	0,822
Dados de regressão	
n	7
Coeficiente angular (a) – inclinação	30,845
Desvio padrão de a	0,141
Coeficiente linear (b) – intercepto	-3,784
Desvio padrão de b	2,538
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9999

*Análise de regressão linear com a equação da reta $y = ax + b$, onde y corresponde a área do pico a 268 nm e x é a concentração em $\mu\text{g/ml}$. n , número de pontos ($\mu\text{g/ml}$) da curva de calibração.

O método mais aplicado para a estimativa dos parâmetros em regressão linear é a estimativa dos mínimos quadrados. Esta função é a soma dos quadrados (soma dos desvios ao quadrado) das medidas dos valores predictos pela linha. Os parâmetros de estimativas a e b são determinados para que a função tenha os mínimos valores. A diferença entre a medida experimental de y_i e o valor estimado de y é chamado de resíduo. Os parâmetros de estimativa (a e b) são tais que a soma dos resíduos quadrados é mínima comparada com qualquer outro conjunto de estimativas. O coeficiente de correlação geralmente é usado como uma medida de correção de um método. Um “bom” método é aquele modelo onde a soma dos quadrados da regressão é próxima a soma total dos quadrados ($SQ_{\text{reg}} \approx SQ_{\text{tot}}$) (Kaps; Lamberson, 2004).

A partir dos dados da análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 9, constatou-se que o método foi linear, uma vez que os valores de SQ_{reg} foram próximos aos da SQ_{tot} , e o valor de F_{exp} foi maior que o $F_{\text{crítico}}$.

Tabela 9. Análise de Variância (ANOVA - apenas uma categoria variável; $\alpha = 0,05$) da curva de calibração da reserpina.

Fontes de variabilidade	SQ	gl	MQ	F _{exp}	F _{crítico} (F _{0,05,1,5})
Regressão	1242703,359	1	1242703,359	47694,922	6,610
Resíduo	130,276	5	26,055		
Total	1242833,635	6			

gl, grau de liberdade; SQ, soma dos quadrados mínimos; MQ, média dos quadrados; F, fator de distribuição F (calculado através MQ_{reg}/MQ_{res}); α , nível de significância.

A curva de calibração apresentou boa linearidade sobre o intervalo proposto (80 a 120%), com um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,9999. A ANVISA (Brasil, 2003) preconiza que para um método ser considerado linear deve fornecer um $r^2 \geq 0,99$, enquanto que o *Food and Drug Administration* (FDA, 1994) e o ICH (2005) exigem um $r^2 \geq 0,999$ e o INMETRO (2007) um $r^2 \geq 0,90$. O coeficiente de correlação 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 (Ribani et al., 2004).

4.3.2.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os LD e LQ da reserpina foram calculados utilizando-se o desvio padrão do intercepto b (DP_a = 2,538) e o coeficiente angular ou inclinação da curva a (IC = 30,845). Os valores encontrados para LD e LQ foram, respectivamente, 0,272 $\mu\text{g/ml}$ e 0,822 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 8), demonstrando a sensibilidade do método.

4.3.2.4. Precisão

Os resultados da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdía) encontram-se listados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Os resultados foram expressos como DPR% das áreas dos picos e dos tempos de retenção médios, todos apresentando valores de DPR% menores que 1%.

A precisão de um método é um parâmetro para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, em condições definidas. Para a concessão de registro de produtos farmacêuticos, a precisão deve obrigatoriamente ser determinada pela repetibilidade e pela precisão intermediária. Como a precisão geralmente é dependente da

concentração do analito, o DPR% pode ser bastante útil na discussão dos resultados, uma vez que é normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande (INMETRO, 2007).

Tabela 10. Repetibilidade (precisão intradia) do método analítico.

Corrida Analítica	AP (mAU)^a	TR (min)^b
1	316,409	7,523
	316,068	7,518
	316,471	7,524
	316,112	7,526
	315,350	7,520
	316,442	7,519
Média ± DP	316,142 ± 0,425	7,522 ± 0,00314
DPR (%)	0,134	0,0418
2	315,915	7,543
	316,293	7,530
	316,085	7,527
	315,991	7,527
	316,534	7,527
	316,015	7,531
Média ± DP	316,139 ± 0,232	7,531 ± 0,00621
DPR (%)	0,0735	0,0825
Média intradia ± DP	316,140 ± 0,00223	7,526 ± 0,00648
DPR (%)	0,000706	0,0861

a. AP, áreas dos picos referentes à concentração a 100% (10,0 µg/ml).

b. TR, tempo de retenção.

Tabela 11. Precisão intermediária (precisão interdia) do método analítico.

Dia	AP (mAU)^a	TR (min)^b
1	317,028	7,571
	317,596	7,556
	317,882	7,555
	317,841	7,562
	318,152	7,575
	317,539	7,548
Média ± DP	317,673 ± 0,385	7,561 ± 0,0103
DPR (%)	0,121	0,136
2	322,558	7,570
	322,916	7,576
	323,797	7,568
	320,990	7,568
	318,035	7,562
	316,513	7,550
Média ± DP	320,801 ± 2,919	7,566 ± 0,00889
DPR (%)	0,910	0,117
Média inter-dia ± DP	319,237 ± 2,212	7,563 ± 0,00318
DPR (%)	0,693	0,0421

a. AP, áreas dos picos referentes à concentração a 100% (10 µg/ml).

b. TR, tempo de retenção.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados (INMETRO, 2007) ou a capacidade de detectar pequenas variações na concentração do analito na amostra, na área do pico e no tempo de retenção. Quanto menor o valor de DPR%, mais precisos serão os resultados (FDA, 1994). Já a precisão intermediária, realizada por diferentes analistas, diferentes instrumentos ou dias diferentes em um mesmo laboratório, é usada para identificar quais destes fatores contribuem significativamente com a variabilidade do resultado final (Green, 1996).

A ANVISA considera um método preciso quando apresenta valores de DPR% não superiores a 5% (Brasil, 2003). O método validado foi considerado preciso, apresentando DPR% menores que 1%, que de acordo com Ribani e colaboradores (2004) é satisfatório (1 a 2%) para métodos que quantificam compostos em macroquantidades. Valores de DPR% igual ou menor que 1% são recomendados pelo FDA (1994), uma vez que caracteriza a repetitividade dos resultados.

4.3.2.5. Exatidão

O método apresentou uma porcentagem média de recuperação de 95,112% ($n=9$). Os resultados referentes à exatidão do método foram expressos como média de recuperação do analito na amostra seguidos dos valores de DPR%, conforme apresentado na Tabela 12.

O ensaio de recuperação constitui-se no método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (Brito et al., 2003). A recuperação é a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, que é extraída e passível de ser quantificada (Ribani et al., 2004). O DPR% das replicatas fornece a análise de variação ou a precisão do método; já a média de recuperação (%) das replicatas indica a exatidão do método (FDA, 1994).

Um critério de exatidão para um método avaliado é que a média de recuperação seja $100 \pm 2\%$ a cada concentração situada em uma faixa linear de 80 a 120% (Green, 1996; Brito et al., 2003). O método validado apresentou uma média de recuperação de 95,112% (DPR%= 3,580%), indicando uma boa exatidão e recuperação para o método, com precisão satisfatória para os resultados (DPR% <

5%). Baseado nos resultados obtidos, a recuperação foi abaixo de 100% e excedeu o limite geral de aceitação (98 a 102%) para a recuperação. No entanto, estes resultados podem ser considerados satisfatórios tendo em vista a complexidade do método e as pequenas quantidades de reserpina adicionadas. Observando os resultados obtidos nos diferentes níveis de concentração separadamente (Tabela 12), pode-se concluir que os resultados na maior concentração foram próximos a 100% e os resultados a concentrações mais baixas obtiveram maiores desvios. A razão para valores de recuperação diferentes de 100% não é devido a perda de analito, uma vez que observações reversas deveriam ter ocorrido (por ex., baixa recuperação a níveis altos de adição). A baixa taxa de recuperação neste caso poderia ser explicada pela pequena quantidade de reserpina adicionada a níveis mais baixos.

Tabela 12. Ensaio de recuperação (%) de reserpina adicionada em amostras de *Rauvolfia sellowii*.

Concentração teórica adicionada (µg/ml)	Concentração real adicionada (µg/ml)	Concentração encontrada (µg/ml)	Recuperação (%)
1,25	1,281	1,244	97,152
	1,299	1,229	94,583
	1,298	1,242	95,701
Média ± DP	1,293±0,0105	1,239±0,00827	95,812±1,288
DPR (%)		0,668	1,344
5,0	5,115	4,806	93,970
	5,190	4,670	89,980
	5,185	4,681	90,283
Média ± DP	5,163±0,0419	4,719±0,0758	91,411±2,221
DPR (%)		1,607	2,430
10,0	10,230	10,110	98,824
	10,380	10,149	97,780
	10,370	10,135	97,735
Média ± DP	10,327±0,0839	10,131±0,0202	98,113±0,616
DPR (%)		0,199	0,628
Média total de recuperação (%)±DP			95,112±3,405
DPR (%)			3,580

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), porcentagens de recuperação do analito próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. De acordo com Ribani e colaboradores (2004) e o INMETRO (2007), a limitação do ensaio de recuperação é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. O composto transferido e adicionado à amostra pode não estar efetivamente no mesmo equilíbrio que se encontra a substância na forma nativa. A presença de

analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas de recuperação. Pelo fato de que outros componentes da matriz possam interferir na separação, detecção ou na quantificação de substâncias, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados e deve se levar em consideração que a eficiência do método varia com a concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações.

4.3.2.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada frente a alterações em valores de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como média das áreas dos picos e dos tempos de retenção em cada parâmetro avaliado, seguido dos valores de DPR% correspondentes. Através do teste de hipóteses, verificou-se que o parâmetro temperatura 20° C apresentou valores médios de área dos picos e de tempo de retenção significativamente diferentes quando comparado às condições selecionadas, uma vez que o pico referente à reserpina coeluiu com outro componente da matriz, formando um ombro no pico (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação da robustez do método analítico.

Parâmetros avaliados		AP (mAU) ± DP ^a	<i>t</i> ^e	TR (min) ± DP ^b	<i>t</i> ^e
Temperatura	20° C	328,268±0,495	-26,802	8,071±0,0537	-8,605
	DPR (%) ^d	2,494		4,434	
	30° C	316,921±0,370	-0,0753	7,383±0,0737	2,876
	DPR (%) ^d	0,00715		1,865	
pH	4,9	317,314±0,887	-0,689	7,554±0,0459	0,502
	DPR (%) ^d	0,0948		0,246	
	5,1	316,805±1,146	0,170	7,537±0,0367	0,926
	DPR (%) ^d	0,0188		0,408	
Condições Selecionadas ^c		316,889±0,491		7,580±0,0456	

a. AP, área média dos picos±DP das observações de três replicatas

b. TR, tempo de retenção médio dos picos ± DP das observações de três replicatas

c. T= 25° C e pH= 5,0

d. DPR% de cada parâmetro avaliado em comparação com as condições selecionadas

e. $t_{\text{estatístico}}$; $g_{l(n-1)} = 2$, $\alpha = 0,05$, $t_{\text{crítico}} = 4,303$

Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (Ribani et al., 2004) e a robustez indica a confiabilidade do método durante o uso rotineiro (Barros, 2001). A robustez do método quando avaliada frente a variações de temperatura da coluna em 5° C apresentou variações significativas a 20° C na média das áreas dos picos e nos tempos de retenção, com DPR maior que 1%. O teste t confirmou a diferença estatisticamente significativa ($t_{\text{exp}} > t_{\text{crítico}}$) quando a temperatura mais baixa foi avaliada. Porém, avaliando a temperatura de 30° C e a influência do pH em 0,1 unidades, o método mostrou-se robusto, com DPR menor que 0,5% e as diferenças foram consideradas não significativas pelo teste t .

De acordo com os resultados de robustez, o pH da fase móvel não altera os valores de área dos picos e tempo de retenção significativamente. Já no parâmetro temperatura, temperaturas mais baixas podem interferir na resolução dos cromatogramas e conseqüentemente na quantificação da reserpina. Apesar da considerável robustez do método frente a temperatura e pH, é interessante manter todos os parâmetros estabelecidos. Recomenda-se manter a temperatura entre 25-30° C e o pH em torno de 5,0, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados.

4.3.2.7. Quantificação de reserpina em cascas caulinares de *R. sellowii* por CLAE

A concentração média de reserpina encontrada no extrato de *R. sellowii* (1000,0 µg/ml), determinada pelas áreas do pico de três soluções de extratos das cascas caulinares (áreas= 19,8464; 19,4721; 19,3669), foi de 0,757 µg/ml, o que corresponde a 0,075% (m/m) de reserpina em matéria seca. A quantidade de reserpina encontrada nas cascas dessecadas do caule foi de 0,01% (m/m).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descrição dos caracteres morfoanatômicos observados na folha, no caule e na casca caulinar de *H. lancifolius* e de *R. sellowii*, juntamente com as ilustrações, contribuem para a identificação destas plantas medicinais e fornecem subsídios que podem ser utilizados como parâmetros para garantir a qualidade dessas drogas vegetais.

A presença de nervuras secundárias de ângulo praticamente reto, de estômatos anisocíticos e de pecíolo com formato circular na folha, a presença de bainha esclerenquimática contínua na casca caulinar, e a ausência de prismas e drusas de oxalato de cálcio na folha e no caule, quando considerados conjuntamente, podem servir de base para diferenciar *H. lancifolius* de outras espécies, como *H. sucuuba*, *H. bracteatus* e *H. stenophyllus*. A descrição morfoanatômica da casca caulinar de *H. lancifolius* assemelha-se àquela presente na Farmacopeia Brasileira 1ª edição (1929) para a agoniada, porém com maior detalhamento e ilustrações para facilitar a análise.

A presença de estômatos paracíticos na folha, de pecíolo com formato plano-convexo e com colênquima angular, de feixes acessórios do tipo anficrival no pecíolo, de drusas de oxalato de cálcio na folha e no caule, de amiloplastos nas células parenquimáticas do xilema no caule e de uma bainha esclerenquimática incompleta na casca caulinar, quando tomados em conjunto, podem subsidiar a diferenciação de *R. sellowii* de outras espécies, como *R. grandiflora* e *R. schuelii*.

Foi possível isolar e identificar três compostos das cascas do caule de *H. lancifolius*, dos quais dois alcaloides indólicos – ajmalina e *epi*-uleína, e um esteroide – β -sitosterol, foram relatados pela primeira vez nessa espécie e também no gênero, contribuindo com a caracterização química dessa droga.

Um método em CLAE-RP-UV foi desenvolvido e validado neste estudo para quantificar reserpina em cascas caulinares de *R. sellowii*, o qual pode ser convenientemente empregado para rotina de controle de qualidade. Os parâmetros avaliados de linearidade, precisão, sensibilidade (LD e LQ), exatidão e robustez foram considerados satisfatórios. Esse método desenvolvido permite identificar e quantificar reserpina no material vegetal e nos extratos de *R. sellowii*, e desta maneira, esse alcaloide pode ser considerado como um marcador químico para essa espécie.

O método final é o seguinte: **Extrato** – Pesar analiticamente 2,50 g de cascas caulinares de *R. sellowii*. Extrair sob refluxo com 100 ml de etanol 96 °GL (pH 8,0-10,0) durante 4 h. Filtrar em algodão. Extrair novamente sob refluxo o resíduo com 100 ml de etanol durante 30 min. Filtrar. Reduzir o extrato a 30 ml e acidificar com 100 ml de H₂SO₄ 0,5 N. Em funil de separação, extrair essa solução ácida 5x com 30 ml de CHCl₃ cada. Descartar a fase aquosa ácida. Limpar a fase CHCl₃ 4x com 30 ml de NaHCO₃ 2% cada. Evaporar a fase CHCl₃ e pesar. **Solução amostra** – Preparar uma solução de 1,0 mg/ml com a fase CHCl₃, em MeOH:acetonitrila (1:1). **Solução padrão** – Preparar soluções com o padrão de reserpina de modo a obter concentrações de 0,625 a 40,0 µg/ml, em MeOH:acetonitrila (1:1). **CLAE** – Injetar as soluções da curva de calibração (20 µl cada) e da solução amostra (1000 µg/ml) em cromatógrafo líquido, utilizando como fase móvel (A) 0,1% de trietilamina e 0,1% de ácido fórmico em H₂O (pH 5,0) e (B) 0,1% de trietilamina e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, em gradiente 0-3 min, 50:50 (A:B); 3-3,10 min, 45:55; 3,10-6 min, 45:55; 6-6,10 min, 0:100; 6,10-7 min, 0:100; 7-7,10 min, 50:50; 7,10-10 min, 50:50, com fluxo de 1,0 ml/min, temperatura da coluna de 25 °C, λ 268 nm e coluna RP18 (ODS2 250 x 4,6 mm, 5 µm). **Teor de reserpina** – no mínimo 0,01%.

Desta forma, este trabalho teve o propósito de contribuir para a caracterização farmacognóstica de *H. lancifolius* e *R. sellowii*, colaborando com a descrição botânica e química dessas duas espécies medicinais. *Himatanthus lancifolius* mostra-se promissora para futuros estudos, principalmente farmacológicos e químicos, tendo em vista o amplo espectro de atividades biológicas, o número de alcaloides ainda desconhecidos e também o uso de suas cascas como matéria-prima para a produção de fitoterápicos. *Rauvolfia sellowii*, por sua vez, é uma espécie ameaçada de extinção e o registro sobre todo o conhecimento a respeito dessa espécie faz-se necessário, em virtude da sua importância na medicina tradicional. Em um contexto farmacêutico, estes resultados podem ser oportunamente empregados para o controle de qualidade destas drogas vegetais e seus derivados.

6. REFERÊNCIAS²³

- Abaul J, Philogène E, Bourgeois P, Mérault G, Poupat C, Ahond A, Potier P 1986. Alcaloïdes indoliques de *Rauwolfia biauriculata*. *J Nat Prod* 49: 829-832.
- Abdel-Kader MS, Wisse J, Evans R, van der Werff H, Kingston DGI 1997. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod* 60: 1294-1297.
- Akinloye BA, Court WE 1980a. Leaf alkaloids of *Rauwolfia oreogiton*. *Phytochemistry* 19: 2741-2745.
- Akinloye BA, Court WE 1980b. Leaf alkaloids of *Rauwolfia volkensii*. *Phytochemistry* 19: 307-311.
- Alquini Y, Bona C, Boeger MRT, Costa CG, Barros CF 2006. Epiderme. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 87-107.
- Amer MA, Court WE 1981. Alkaloids of *Rauwolfia nitida* root bark. *Phytochemistry* 20: 2569-2573.
- Amer MM, Court WE 1980. Leaf alkaloids of *Rauwolfia vomitoria*. *Phytochemistry* 19: 1833-1836.
- Aniszewski T 2007. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Amsterdam: Elsevier.
- Arambarri AM, Freire SE, Colares MN, Bayón ND, Novoa MC, Monti C, Stenglein SA 2008. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones Forest of the Paranaense province (Argentina). Part 2. *Bol Soc Argent Bot* 43: 31-60.
- Araújo RR, Silva e Silva AM, Gil FS 1984. *Plumeria rubra* L. var. *alba* - Apocynaceae. Anatomia foliar. *Rodriguésia* 36: 67-72.
- Awad AB, Fink CS 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr* 130: 2127-2130.
- Bacchi EM 1996. Controle de Qualidade de Fitoterápicos. In: Di Stasi, L.C. (org.) *Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, pp. 169-186.
- Baggio CH, Otofujji GD, de Souza WM, Santos CAD, Torres LMB, Rieck L, Marques MCD, Mesia-Vela S 2005. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med* 71: 733-738.
- Barbosa-Filho JM, Lima CSA, Amorim ELC, Sena KXFR, Almeida JRGS, da Cunha EVL, Silva MS, Agra MF, Braz-Filho R 2004. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. *Int J Experimental Botany* 53: 221-228.
- Barreto AS, Amaral ACF, Silva JRA, Schripsema J, Rezende CM, Pinto AC 2007. Ácido 15-desmetilisoplumierídeo, um novo iridoide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. *Química Nova* 30: 1133-1135.
- Barreto AS, de Carvalho MG, Nery ID, Gonzaga L, Kaplan MAC 1998. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J Braz Chem Soc* 9: 430-434.
- Barreto AS, Rezende CM, Pinto AC, Viana VRC, Tavares ES 2001. Contribuição ao estudo anatômico de *Plumeria rubra* L. forma *acutifolia* (Ait) Woodson. *Revista Brasileira de Farmácia* 82: 9-11.
- Barros CB 2001. Validação de métodos analíticos. *Biológicas* 64: 175-177.
- Barros CF 1986/88. *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae). Anatomia Foliar. *Rodriguésia* 64/66: 25-31.

²³ Citações e referências conforme padrão da Revista Brasileira de Farmacognosia.

- Batista CVF, Schripsema J, Verpoorte R, Rech SB, Henriques AT 1996. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. *Phytochemistry* 41: 969-973.
- Beçak W, Paulete J 1976. *Técnicas de Citologia e Histologia*, vol. 1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.
- Belem-Pinheiro ML, Imbiriba da Rocha AF, Quentin-Leclercq J, Wauters JN, Angenot L 1988. Alkaloids of *Rauwolfia sellowii* from Amazônia. *J Pharm Belg* 43: 379-381 *apud* Carlos LA 2007. *Alcaloides de Rauwolfia grandiflora e Rauwolfia mattfeldiana (Apocynaceae)*. Campos dos Goytacazes, 200p. Tese de Doutorado - Centro de Ciências Tecnológicas e Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Berlyn GP, Miksche JP 1976. *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*. Ames: Iowa State University.
- Bhatia BB 1942. On the use of *Rauwolfia serpentina* in high blood pressure. *J Indian Med Assoc* 11: 262.
- Biemann K, Bommer P, Burlingame AL, McMurray WJ 1964. High-resolution mass spectra of ajmaline and related alkaloids. *J Am Chem Soc* 86: 4624-4628.
- Borris RP, Lankin DC, Cordell GA 1983. Studies on the uleine alkaloids I. Carbon-13 NMR studies on uleine, 20-*epi*-uleine and (4S)-uleine-Nb-oxide. *J Nat Prod* 46: 200-205.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Grael CFF, Netto-Junior NL, Monte-Mór RLM 2009. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 19: 478-487.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Brasil 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução-RE n. 899 de 20 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 15 out 2008.
- Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos*. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 05 ago 2009.
- Brasil 2006. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Decreto n. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências*. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22681&word>>. Acesso em: 05 ago 2009.
- Brasil 2009. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE n. 753 de 09 de março de 2009. Concede a Renovação de Registro de Medicamento Novo, Retificação de Publicação de Registro, Registro de Nova via de Administração no País - Medicamento novo; declarar a Caducidade de Registro de Medicamento; e publicar o Cancelamento de Registro do Medicamento a Pedido, Cancelamento de Registro da Apresentação do Medicamento a Pedido, conforme relação anexa*. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=36023&word>>. Acesso em: 03 nov 2009.
- British Pharmacopoeia 2007. 5th edition. CD-ROM.

- Brito NM, Amarante-Júnior OP, Polese L, Ribeiro ML 2003. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13: 129-146.
- Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH 1964. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Volume I: Alkaloids*. San Francisco: Holden-Day.
- Campbell JIA, Mortensen A, Molgaard P 2006. Tissue lipid lowering-effect of a traditional Nigerian anti-diabetic infusion of *Rauwolfia vomitoria* foilage and *Citrus aurantium* fruit. *J Ethnopharmacol* 104: 379-386.
- Cancelieri NM, Vieira IJC, Schripsema J, Mathias L, Braz-Filho R 2002. Darcyribeirine, a novel pentacyclic indole alkaloid from *Rauwolfia grandiflora* Mart. *Tetrahedron Lett* 43: 1783-1787.
- Carlos LA 2007. *Alcaloides de Rauwolfia grandiflora e Rauwolfia mattfeldiana (Apocynaceae)*. Campos dos Goytacazes, 200p. Tese de Doutorado - Centro de Ciências Tecnológicas e Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Carmo EJS, Diniz BM, Nascimento MS, Melo RSF, Allem LN, Morais SR, Figueiredo ADL 2005. *Caracterização anatômica de folhas adultas de Himatanthus obovatus (M. Arg.) Wood (Apocynaceae)*. In: Seminário de Iniciação Científica (SIC-UEG), Universidade Estadual de Goiás. Disponível em: <http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2005/arquivos/biologicas/caracterizacao_anatomica.pdf>. Acesso em: 29 out 2009.
- Castillo D, Arevalo J, Herrera F, Ruiz C, Rojas R, Rengifo E, Vaisberg A, Lock O, Lemesre JL, Gornitzka H, Sauvain M 2007. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J Ethnopharmacol* 112: 410-414.
- Castro MM, Machado SM 2006. Células e Tecidos Secretores. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 179-203.
- César IC, Braga FC, Soares CDV, Nunan EA, Pianetti GA, Condessa FA, Barbosa TAF, Campos LMM 2006. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J Chromatogr B* 836: 74-78.
- Colares AV, Cordeiro LN, Costa JGM, Silveira ER, Campos AR, Cardoso AH 2008. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). *Pharmacogn Mag* 4: 73-77.
- Cordell GA 1981. *Introduction to Alkaloids: a biogenetic approach*. New York: John Wiley & Sons.
- Cordell GA, Quinn-Beatie ML, Farnsworth NR 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res* 15: 183-205.
- Corrêa MP 1926. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, vol. 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Costa CG, Callado CH, Coradin VTR, Carmello-Guerreiro SM 2006. Xilema. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 129-154.
- Costa CG, Costa EL 1980. *Plumeriopsis ahouai* (L.) Rusby et Woodson, Apocynaceae. Considerações anatômicas. *Arq Jard Bot Rio de Janeiro* 24: 117-140.
- Cronquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.

- Cutter EG 1986. *Anatomia Vegetal*. São Paulo: Roca.
- Dalmarco JB 2009. *Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel: análise fitoquímica e atividade biológica*. Florianópolis, 91p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- de Souza TP, Holzschuh MH, Lionço MI, González-Ortega G, Petrovick PR 2002. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. *J Pharmaceut Biomed* 30: 351-356.
- Debes MA, Luque AC, Arias ME, Albornoz PL 2008. Anatomía foliar de *Rauwolfia schuelii* Speg. (Apocynaceae), en la provincia de Tucumán, Argentina. *Lilloa* 45: 39-46.
- Dewick PM 2002. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. England: John Wiley & Sons.
- Dhooghe L, Mesia K, Kohtala E, Tona L, Pieters L, Vlietinck AJ, Apers S 2008. Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of *Nauclea pobeguinii*. *Talanta* 76: 462-468.
- Di Stasi LC 1996. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L.C. (org.) *Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da UNESP, p. 109-127.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA 2002. Gentianales medicinais. In: Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A. (orgs.) *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora UNESP, p. 375-385.
- Ding B, Zhou T, Fan G, Hong Z, Wu Y 2007. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD. *J Pharmaceut Biomed* 45: 219-226.
- Djerassi C, Fishman J, Gorman M, Kutney JP, Pakrashi SC 1957. Alkaloid studies. XVI. Alkaloids of *Rauwolfia tetraphylla* L. The structures of tetraphylline and tetraphyllicine. *J Am Chem Soc* 79: 1217-1222.
- Ducke A 1955. Critical notes on some Brazilian Apocynaceae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 27: 381-384.
- Duke JA 1997. *The green pharmacy: new discoveries in herbal medicines for common diseases and conditions from the nation's foremost authority on healing herbs*. Pennsylvania: Rodale Press.
- Elisabetsky E, Souza GC 2004. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 107-122.
- Endo Y, Hayashi H, Sato T, Maruno M, Ohta T, Nozoe S 1994. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull* 42: 1198-1201.
- Endress ME, Bruyns PV 2000. A revised classification of the Apocynaceae s.l. *Bot Rev* 66: 1-51.
- Esau K 1974. *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher.
- Facchini PJ 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu Rev Plant Phys* 52: 29-66.
- Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO 2004. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 229-245.

- Farias MR 2004. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 263-288.
- Farmacopeia Brasileira 1ª edição 1929. Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 1. ed. São Paulo: Editora Nacional.
- Farmacopeia Brasileira 2ª edição 1959. Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira.
- Farmacopeia Brasileira 4ª edição 1988. Parte I. São Paulo: Atheneu.
- Ferreira JLP, Amaral ACF, Araújo RB, Carvalho JR, Proença CEB, Fraga SAPM, Silva JRA 2009. Pharmacognostical comparison of three species of *Himatanthus*. *Int J Botany* 5: 171-175.
- Ferrucci L, Koch I, Teixeira SP 2007. *Anatomia foliar de espécies americanas de Rauwolfia L. (Apocynaceae)*. In: 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica, Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/15Siicusp/3135.pdf>>. Acesso em: 29 out 2009.
- Fierro A, Vásquez Y, Reyes-Parada M, Sepúlveda-Boza S 2004. Determinación cuantitativa del β -sitosterol presente en vegetales de la dieta. Posibles implicancias para su uso preventivo en poblaciones susceptibles. *Clinica y Ciencia* 2: 43-48.
- Food and Drug Administration (FDA) 1994. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. 33p.
- França OO, Brown RT, Santos CAM 2000. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia* 71: 208-210.
- Frederich M, Tits M, Angenot L 2008. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *T Roy Soc Trop Med H* 102: 11-19.
- Galindo-Leal C, Câmara IG 2005. *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. São Paulo/Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional. Disponível em: <www.corredores.org.br/?pageld=adminOpenDoc&docId=1534>. Acesso em: 23 nov 2009.
- Gerasimenko I, Sheludko Y, Unger M, Stöckigt J 2001. Development of an efficient system for the separation of indole alkaloids by High Performance Liquid Chromatography and its applications. *Phytochem Analysis* 12: 96-103.
- Goenka AH 2007. Rustom Jal Vakil and the saga of *Rauwolfia serpentina*. *J Med Biography* 15: 195-200.
- Gohari AR, Saeidnia S, Shaverdi AR, Yassa N, Malmir M, Mollazade K, Naghinejad AR 2009. Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. *Eurasian J Biosci* 3: 64-68.
- Gonçalves CR 1964. Sobre a anatomia da folha de *Rauwolfia grandiflora* Mart. (Apocynaceae). *Arq Jard Bot Rio de Janeiro* 18: 293-306.
- Govindarajan R, Singh DP, Singh AP, Pandey MM, Rawat AKS 2007. A validated HPLC method for quantification and optimization of furocoumarins in different extracts of fruits of *Heracleum candicans*. *Chromatographia* 66: 401-405.
- Green JM 1996. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry* 68: 305-309.
- Habib MR, Nikkon F, Rahman M, Haque ME, Karim MR 2007. Isolation of β -sitosterol from methanolic extract of root bark of *Calotropis gigantea* (Linn). *Pakistan J Biol Sci* 10: 4174-4176.
- Habib MS, Court WE 1974. Leaf alkaloids of *Rauwolfia caffra*. *Phytochemistry* 13: 661-662.

- Hanhinen P, Lounasmaa M 2001. Revision of the structure of ajmalimine. *J Nat Prod* 64: 686-687.
- Henriques AT, Limberger RP, Kerber VA, Moreno PRH 2004. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC p. 765-791.
- Hickey LJ 1974. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. *Bol Soc Argent Bot* 16: 1-26.
- Hochstein FA 1955. Alkaloids of *Rauwolfia sellowii*. *J Am Chem Soc* 77: 5744-5745.
- Hochstein FA, Murai K, Boegemann WH 1955. Alkaloids of *Rauwolfia heterophylla*. *J Am Chem Soc* 77: 3551-3554.
- Howard RA 1988. The petiole. In: Metcalfe, C.R., Chalk, L. (orgs.) *Anatomy of the Dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem with a brief history of the subject*. Oxford: Clarendon Press, p. 88-96.
- Hu XJ, He HP, Zhou H, Di YT, Yang XW, Hao XJ, Kong LY 2006. New indole alkaloids from *Rauwolfia yunnanensis*. *Helv Chim Acta* 89: 1344-1350.
- Hutabarat LS, Mulholland M, Greenfield H 1998. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean. *J Chromatogr A* 795: 377-382.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) 2007. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008*. 25p.
- International Conference of Harmonisation (ICH) 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 17p.
- Isharwal S, Gupta S 2006. Rustom Jal Vakil: his contributions to cardiology. *Tex Heart J* 33: 161-170.
- Itoh A, Kumashiro T, Yamaguchi M, Nagakura N, Mizushina Y, Nishi T, Tanahashi T 2005. Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. *J Nat Prod* 68: 848-852.
- Iwu MM, Court WE 1978. Alkaloids of *Rauwolfia cumminsii* stem. *Phytochemistry* 17: 1651-1654.
- Jácome RLRP, Oliveira AB, Raslan DS, Wagner H 2004. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). *Química Nova* 27: 897-900.
- Jiménez G, Hasegawa M, Rodríguez M, Estrada O, Méndez J, Castillo A, Gonzales-Mujica F, Motta N, Vásquez J, Romero-Vecchione E 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J Ethnopharmacol* 77: 77-83.
- Jin GB, Hong T, Inoue S, Urano T, Cho S, Otsu K, Kitahara Y, Cyong JC 2002. Augmentation of immune cell activity against tumor cells by *Rauwolfia radix*. *J Ethnopharmacol* 81: 365-372.
- Johansen DA 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Jokela R, Lounasmaa M 1996. A ¹H- and ¹³C-NMR study of seven ajmaline type alkaloids. *Planta Med* 62: 577-579.
- Joly AB 1998. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 12 ed. São Paulo: Editora Nacional.
- Kan C, Potier P, Kan SK, Jokela R, Lounasmaa M 1986. Indole alkaloids from *Rauwolfia media*. *Phytochemistry* 25: 1783-1784.
- Kaplan M, Mutlu EA, Benson M, Fields JZ, Banan A, Keshavarzian A 2007. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complement Ther Med* 15: 207-216.

- Kaps M, Lamberson WR 2004. *Biostatistics for animal science*. Oxfordshire: CABI Publishing.
- Karmakar T, Chakraborty DP 1983. 7-dehydrositosterol from *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* 22: 608-609.
- Kato L 2001. *Estudo fitoquímico de espécies brasileiras de Rauwolfia (Apocynaceae)*. Campinas, 213p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- Kato L, Braga RM, Koch I, Kinoshita LS 2002. Indole alkaloids from *Rauwolfia bahiensis* A.DC. (Apocynaceae). *Phytochemistry* 60: 315-320.
- Klohs MW, Draper MD, Keller F, Malesh W, Petracek FJ 1955. Alkaloids of *Rauwolfia serpentina* Benth. II. The isolation of naturally occurring py-tetrahydroserpentine (ajmalicine) and a contribution toward its structure. *J Am Chem Soc* 75: 4925.
- Klyushnichenko VE, Yakimov SA, Tuzova TP, Syagailo YA, Kuzovkina IN, Wulfson AN, Miroshnikov AI 1995. Determination of indole alkaloids from *R. serpentina* and *R. vomitoria* by high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 704: 357-362.
- Koch I 1994. *Caracterização taxonômica dos representantes da família Apocynaceae na região de Bauru - SP*. Campinas, 205p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Koch I 2002. *Estudos das espécies neotropicais do gênero Rauwolfia L. (Apocynaceae)*. Campinas, 301p. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Kovganko NV, Kashkan ZN, Borisov EV, Batura V 1999. ¹³C NMR Spectra of β -sitosterol derivatives with oxidized rings A and B. *Chem Nat Compd* 35: 646-649.
- Kraus JE, Arduin M 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Edur.
- Kreig MB 1964. *Green Medicine: The search for plants that heal*. Chicago: Rand McNally & Company.
- Kutchan TM, Frick S, Weid M 2008. Engineering plant alkaloid biosynthetic pathways: progress and prospects. In: Bohnert, H.J., Nguyen, H., Lewis, N.G. (orgs.) *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology: Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathway*. Amsterdam: Elsevier, p. 283-310, cap. 10.
- Lacobucci G, Deulofeu V 1957. Alkaloids from *Rauwolfia schueli*. *J Org Chem* 22: 94-95.
- Larrosa CRR 2004. *Morfoanatomia foliar e caulinar de espécies medicinais de Apocynaceae: Himatanthus sucuuba (Spruce) Woodson, Mandevilla coccinea (Hook. & Arn.) Woodson e Forsteronia glabrescens Müll. Arg.* Curitiba, 89p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
- Larrosa CRR, Duarte MR 2005. Morfoanatomia de folhas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson, Apocynaceae. *Acta Farm Bonaer* 24: 165-171.
- Levinson HZ 1976. The defensive role of alkaloids in insects and plants. *Experientia* 32: 408-411.
- Lima VB, Braga RM, Koch I 1998. Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus*. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia. *Livro de Resumos*, p. 118.
- Limberger RP, Aleixo AM, Fett-Neto AG, Henriques AT 2007. Bioconversion of (+)- and (-)-alpha-pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of

- Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *Electron J Biotechn* 10: 500-507.
- Lopes JF 2008. *Ioimbina e uleína isolados de Himatanthus lancifolius (Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae*. Curitiba, 79p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
- Lorenzi H, Matos FJA 2008. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Machado-Junior JC, Florão A, Mattana FVR, Rocha FH, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2006. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 16: 645-655.
- Mahlberg PG 1993. Laticifers: an historical perspective. *Bot Rev* 59: 1-23.
- Maldaner G 2005. *Estudo dos metabólitos secundários de Conzalia buxifolia e Scutia buxifolia e suas atividades antimicrobianas*. Santa Maria, 96p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria.
- Mandinaveitia A, Valencia E, Bermejo J, Gonzalez AG 1995. Indole alkaloids from *Rauvolfia sprucei*. *Biochem Syst Ecol* 23: 877.
- Manske RHF, Holmes HL 1950. *The Alkaloids: chemistry and physiology*, vol. 1. New York: Academic Press.
- Mauseth JD 1988. *Plant Anatomy*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings.
- Mazzoni-Viveiros SC, Costa CG 2006. Periderme. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 237-263.
- Menezes NL, Silva DC, Pinna GFAM 2006. Folha. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 303-326.
- Menezes PR, Schwarz EA, Santos CAM 2004. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia* 75: 398-400.
- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, de Paula JE, Grellier P, Espindola LS 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 783-787.
- Metcalfe CR 1988. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: Metcalfe, C.R., Chalk, L. (orgs.) *Anatomy of the Dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem with a brief history of the subject*. Oxford: Clarendon Press, p. 63-75.
- Metcalfe CR, Chalk L 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*, vol. 2. Oxford: At the Clarendon.
- Miranda AL, Silva JR, Rezende CM, Neves JS, Parrini SC, Pinheiro ML, Cordeiro MC, Tamborini E, Pinto AC 2000. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuba*. *Planta Med* 66: 284-286.
- Morel AF, Graebner IB, Porto C, Dalcol II 2006. Study on the antimicrobial activity of *Himatanthus sucuba*. *Fitoterapia* 77: 50-53.
- Muñoz S, Mestres M, Busto O, Guasch J 2008. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: validation study and response comparison of different standards. *Anal Chim Acta* 628: 104-110.
- Nardin JM, Souza WM, Lopes JF, Florão A, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2009. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. *Planta Med* 74: 1253-1258.

- Nasser AMAG, Court WE 1983. Leaf alkaloids of *Rauwolfia caffra*. *Phytochemistry* 22: 2297-2300.
- Neto CC, Owens CW, Langfield RD, Comeau AB, Onge JS, Vaisber AJ, Hammond GB 2002. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *J Ethnopharmacol* 79: 133-138.
- Niemenak N, Onomo PE, Fotso, Lieberei R, Ndoumou DO 2008. Purine alkaloids and phenolic compounds in three *Cola* species and *Garcinia kola* grown in Cameroon. *S Afr J Bot* 74: 629-638.
- Núñez CV 1996. *Sesquiterpeno e esteróides da casca do tronco de Guarea guidonia (L.) Sleumer (Meliaceae)*. São Paulo, 118p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Oliveira F, Akissue G, Akissue MK 1991. *Farmacognosia*. São Paulo/Rio de Janeiro: Atheneu.
- Pacheco JM 1980. Contribuição ao estudo anatômico da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don var. *roseus* (Apocynaceae). *Rodriguésia* 32: 39-54.
- Pakrashi SC, Djerassi C, Wasicky R, Neuss N 1955. Alkaloid studies. IX. *Rauwolfia* alkaloids. IV. Isolation of reserpine and other alkaloids from *Rauwolfia sellowii* Muell. Argov. *J Am Chem Soc* 77: 6687-6689.
- Pérez JAM, González CG, Rodrigues MRS, Llerena LTN 1991. 3-*epi*- β -yohimbine from roots of *Rauwolfia linearifolia*. *Phytochemistry* 30: 1352-1353.
- Pesewu GA, Cutler RR, Humber DP 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol* 116: 102-111.
- Plumel MM 1991. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae). Révision Taxonomique. *Bradea* 5: 1-101.
- Poser GV, Andrade HHR, Silva KVCL, Henriques AT 1990. Genotoxic, mutagenic and recombinogenic effects of *Rauwolfia* alkaloids. *Mutat Res* 232: 37-43 *apud* Carlos LA 2007. *Alcaloides de Rauwolfia grandiflora e Rauwolfia mattfeldiana (Apocynaceae)*. Campos dos Goytacazes, 200p. Tese de Doutorado - Centro de Ciências Tecnológicas e Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Presibella MM, Santos CAM, Weffort-Santos AM 2003. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. *Rev Bras Farmacogn* 13: 75-82.
- Quintans-Júnior LJ, Silva DA, Siqueira JS, Souza MFV, Almeida RN, Silva-Júnior RGC 2007. Anticonvulsivant properties of the total alkaloid fraction of *Rauwolfia ligustrina* Roem. et Schult. in male mice. *Rev Bras Farmacogn* 17: 176-180.
- Rattmann YD, Terluk MR, Souza WM, Santos CA, Biavatti MW, Torres LB, Mesia-Vela S, Rieck L, da Silva-Santos JE, Marques MC 2005. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J Ethnopharmacol* 100: 268-275.
- Rech SB, Batista CVF, Schripsema J, Verpoorte R, Henriques AT 1998. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. *Plant Cell Tiss Org* 54: 61-63.
- Reis MS, Mariot A, Steenbock W 2004. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 45-74.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27: 771-780.

- Roeser KR 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos* 61: 33-36.
- Sabri NN, Court WE 1978. Stem alkaloids of *Rauwolfia vomitoria*. *Phytochemistry* 17: 2023-2026.
- Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M 2001. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry* 57: 1273-1276.
- Scatena VL, Scremin-Dias E 2006. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. In: Appezato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (orgs.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora da UFV, p. 109-127.
- Schripsema J, Dagnino D, Gosmann G 2004. Alcalóides Indólicos. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 819-846.
- Schripsema J, Verpoorte R 1991. Rapid identification of trace amounts of indole alkaloids: analysis of the aromatic pattern from the ¹H-NMR spectrum. In: Rahman, A.U. (org.) *Studies in Natural Products Chemistry. Volume 9. Structure and Chemistry (Part B)*. Amsterdam: Elsevier, p. 163-197.
- Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L, Thoo-Lind PK, Sarker SD 2005. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. *Tetrahedron* 61: 9001-9006.
- Silva GLC, Gaertner P, Marson PG, Schwarz EA, Santos CAM 2004. An ethnopharmacobotanical survey in Salto Caxias Hydroelectric Power Plant in Paraná State, Brazil, before the flooding. *Acta Farm Bonaer* 23: 148-153.
- Silva JRA, Amaral ACF, Siani AC, Rezende CM, Felcman J, Pinto AC 2003. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. *Acta Amazonica* 33: 105-110.
- Silva JRA, Amaral ACF, Silveira CV, Rezende CM, Pinto AC 2007. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. *Acta Amazonica* 37: 119-122.
- Silva JRA, Rezende CM, Pinto AC, Pinheiro MLB, Cordeiro MC, Tamborini E, Young CM, Bolzani VD 1998. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Química Nova* 21: 702-704.
- Simões AO 2000. *As Apocynaceae s.str. da região de Carrancas, MG*. Campinas, 184p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Simões CMO, Farias MR, Alexandre RF 2006. Preparação dos extratos. In: Simões, C.M.O., Farias, M.R., Alexandre, R.F. (orgs.) *Apostila de Farmacognosia*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL 2004. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 289-326.
- Souza-Fagundes EM, Queiroz ABR, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Alves TMA, Zani CL 2002. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1207-1212.
- Souza MS, Cordeiro MS, Rosas EC, Henriques MGOM, Siani AC 2006. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. *Pharmacogn Mag* 2: 216-219.

- Souza WM 2007. *Estudo Químico e das Atividades Biológicas dos Alcalóides Indólicos de Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae – (agoniada)*. Curitiba, 176p. Tese de Doutorado - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
- Souza WM, Brehmer F, Nakao LS, Stinghen AEM, Santos CAM 2007. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. *Rev Bras Farmacogn* 17: 191-196.
- Souza WM, Stinghen AE, Santos CA 2004. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia* 75: 750-753.
- Spina AP 2004. *Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero Himatanthus Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)*. Campinas, 197p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas.
- Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D 2002. High-performance liquid chromatography, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *J Chromatogr A* 967: 85-113.
- Sudha CG, Obul Reddy B, Ravishankar GA, Seenii S 2003. Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant. *Biotechnol Lett* 25: 631-636.
- Suffredini IB, Varella D, Oliveira AA, Younes RN 2002. *In vitro* anti-HIV and antitumor evaluation of Amazonian plants belonging to the Apocynaceae family. *Phytomedicine* 9: 175.
- Taiz L, Zeiger E 2002. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: Taiz, L., Zeiger, E. (orgs.) *Plant Physiology*. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associations, p. 283-308, cap. 13.
- The Angiosperm Phylogeny Group 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* 141: 399-436.
- Theunis MHL, Foubert K, Pollier J, Gonzalez-Gusman M, Goossens A, Vlietinck AJ, Pieters LAC, Apers S 2007. Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: development and validation. *Phytochemistry* 68: 2825-2830.
- Tikhomiroff C, Jolicoeur M 2002. Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 955: 87-93.
- Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AJ 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 61: 57-65.
- Tropicos. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <www.tropicos.org>. Acesso em: 08 dez 2008.
- USP30 – NF25: United States Pharmacopoeia – National Formulary 2007. 30th revision of United States Pharmacopoeia – 25th National Formulary. CD-ROM.
- Veloso MP, Nagem TJ, de Oliveira TT 1999. Beta-dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem Syst Ecol* 27: 669-671.
- Villegas LF, Fernandez ID, Maldonado H, Torres R, Zavaleta A, Vaisberg AJ, Hammond GB 1997. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *J Ethnopharmacol* 55: 193-200.
- Wachsmuth O, Matusch R 2002. Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. *Phytochemistry* 61: 705-709.
- WHO 1998. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: World Health Organization.

- WHO 2002. *WHO Model List of Essential Medicines*. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/a76618.pdf>>. Acesso em: 05 dez 2008.
- Wilkinson HP 1988. The plant surface. In: Metcalfe, C.R., Chalk, L. (orgs.) *Anatomy of the Dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem with a brief history of the subject*. Oxford: Clarendon Press, p. 97-165.
- Wood CA, Lee K, Vaisberg AJ, Kingston DG, Neto CC, Hammond GB 2001. A bioactive spirolactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull* 49: 1477-1478.
- Woodson RE 1957. The Botany of *Rauwolfia*. In: Woodson, R.E., Youngken, H.W., Schlittler, E., Schneider, J.A. (orgs.) *Rauwolfia: botany, pharmacognosy, chemistry and pharmacology*. Toronto: Little, Brown and Company, p. 3-31.
- Zhang F, Dryhurst G 2001. Chromatographic separation and spectrometric identification of the oxidation products from a tetrahydro-isoquinoline alkaloid. *J Pharmaceutic Biomedic* 25: 181-189.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)