

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tecnologia de obtenção de comprimidos à base de
resina/extrato de Jalapa do Brasil – *Operculina*
macrocarpa (L.) Urban)-
e validação da metodologia analítica

LUCIANA RAMOS DE LIMA

Recife, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tecnologia de obtenção de comprimidos à base de
resina/extrato de Jalapa do Brasil – (*Operculina
macrocarpa* (L.) Urban)- e validação da metodologia
analítica

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produção e Controle.

LUCIANA RAMOS DE LIMA

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

Lima, Luciana Ramos de

Tecnologia de obtenção de comprimidos à base de resina/extrato de Jalapa do Brasil – (*Operculina macrocarpa* (L.) Urban) – e validação da metodologia analítica / Luciana Ramos de Lima. – Recife : O Autor, 2006.

63 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2006.

Inclui bibliografia.

1.Ciências farmacêuticas – Tecnologia de medicamentos. 2. Fitoterápicos – *Operculina macrocarpa* (L.) Urban (Jalapa do Brasil) – Caracterização e padronização do extrato. 3. Otimização e validação da metodologia analítica – Quantificação da matéria prima. 4. Farmacologia – Avaliação da atividade laxante. 5. Tecnologia de medicamentos – Extrato da *O macrocarpa* – Desenvolvimento da forma comprimido. I. Título.

615.012
615.32

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-269

Dedicatória
Aos meus pais, que sempre estiveram do meu lado,
me apoiando nos momentos mais difíceis.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 03 de março 2006.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 03 de março de 2006 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Renata Fischer (**Faculdade Maurício de Nassau**).

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por mais um projeto realizado.

Aos meus pais, Osmundo e Fátima e ao meu irmão Edu por toda paciência e carinho a mim dispensados.

Ao meu avô Waldemar (*i.m.*), meu avô Jerônimo (*i.m.*) e minha avó Francisca (*i.m.*) pelas boas lembranças deixadas.

A toda a minha família pelo incentivo e torcida.

Ao meu orientador professor Dr. Pedro José Rolim Neto pelo apoio e orientação.

Ao professor Dr. Haroudo Sátiro Xavier pela amizade, confiança e ensinamentos.

À professora Dra. Ivone pela colaboração e atenção dispensada no desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe do LTM pela ajuda e companheirismo.

Ao LAFEPE, em especial a COPED, pelo incentivo e disponibilização de materiais e infraestrutura.

Ao NCQMC pela permissão para a realização de alguns ensaios presentes neste trabalho, professora Dra. Miracy, Ruth, Rosário, Junior.

Ao Laboratório de Farmacognosia pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e aos grandes amigos q lá eu fiz: Jovita, Diogo, Clebio, Kesia, Jana, Laurinha, Elis, Guedes, Evani e Cristiana.

Às minhas grandes amigas Danielle Lordão, Juliana Meira, Vandessa, Aila, Luciana Araújo, Janda e Cris Gadelha por estarem por perto quando mais precisei de força pra continuar.

Aos colegas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho: Jaffe, Fernando, Osnir, Elis, Leilyane, Marcão, Marcílio, Lívia, Eilika, Flávia, Rosali, Zênia, Deborah, Lamartine, Rose, Luciana, Lú, Bruno e todos os demais funcionários do Controle de qualidade do LAFEPE.

Aos meus grandes amigos Alfredo, Eduardinho, Patricinho, Deda, Nelsinho, Dayse, Eli, Dani, Aninha, Rafa, Rafinha, Lícia e Ricardo pela amizade, carinho, apoio e pelos momentos de descontração.

**“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário”**

Einstein

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| Sumário ----- | vii |
| Lista de Figuras ----- | ix |
| Lista de Tabelas ----- | x |
| Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos ----- | xi |
| Resumo ----- | xii |
| Abstract ----- | xiii |
| CAPÍTULO I - Introdução ----- | 14 |
| 1.2. Objetivo----- | 17 |
| 1.2.1.Objetivo geral----- | 17 |
| 1.2.2 Objetivo específico ----- | 17 |
| 1.3 Referências Bibliográficas ----- | 18 |
| CAPÍTULO II – Caracterização e padronização do extrato hidroalcoólico de <i>Operculima macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 19 |
| 2.1 Abordagem fitoquímica de <i>Operculima macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 19 |
| 2.1.1. Introdução ----- | 19 |
| 2.1.2. Materiais ----- | 19 |
| 2.1.3. Métodos ----- | 22 |
| 2.1.4. Resultados e Discussão ----- | 24 |
| 2.2. Obtenção de resinas glicosídicas a partir do pó de <i>Operculima macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 25 |
| 2.2.1. Método ----- | 25 |
| 2.2.2. Resultados e Discussão ----- | 25 |
| 2.3. Estudo comparativo entre a amostra de aguardente alemã e resíduo metanólico obtido----- | 27 |
| 2.3.1. Material ----- | 27 |
| 2.3.2. Método ----- | 27 |
| 2.3.3. Resultados e Discussão ----- | 28 |
| 2.4. Avaliação da presença de polifenóis no extrato metanólico ----- | 28 |
| 2.4.1. Métodos ----- | 28 |
| 2.4.2. Resultados e Discussão ----- | 29 |
| 2.5. Hidrólise ácida dos extratos metanólico e clorofórmico da <i>Operculima macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1.Métodos ----- | 29 |
| 2.5.2. Resultados e Discussão ----- | 30 |
| 2.6.Conclusão ----- | 31 |
| 2.7.Padronização dos extratos ----- | 31 |
| 2.7.1.Métodos ----- | 31 |
| 2.7.2. Resultados e Discussão ----- | 32 |
| 2.8. Referências Bibliográficas ----- | 34 |
| CAPÍTULO III- Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápico contendo <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | |
| 3.1 Resumo ----- | 36 |
| 3.2 Abstract ----- | 37 |
| 3.3 Introdução ----- | 37 |
| 3.4 Materiais e Métodos ----- | 39 |
| 3.4.1 Material ----- | 39 |
| 3.4.2 Métodos ----- | 39 |
| 3.5 Resultados e Discussão ----- | 42 |
| 3.6 Conclusão ----- | 44 |
| 3.7 Referências Bibliográficas ----- | 45 |
| CAPÍTULO IV – Avaliação da atividade laxante da Jalapa do Brasil – <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | |
| 4.1 Introdução ----- | 50 |
| 4.2 Materiais e Métodos ----- | 51 |
| 4.3 Resultados e Discussão ----- | 52 |
| 4.4.Referências Bibliográficas ----- | 53 |
| CAPÍTULO V – Desenvolvimento farmacotécnico industrial de comprimidos de Jalapa do Brasil – <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | |
| 5.1.Introdução ----- | 54 |
| 5.2.Materiais e Métodos ----- | 57 |
| 5.3 Resultados e Discussão ----- | 59 |
| 5.4. Conclusão ----- | 61 |
| 5.5 Referências Bibliográficas ----- | 62 |
| CAPÍTULO VI – Conclusões Gerais ----- | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO I | |
| Figura 1 e 2. Inflorescência e hábito <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 15 |
| Figura 3 e 4. Tubérculos de <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 16 |
| CAPÍTULO II | |
| Figura 5. Balão contendo resíduo metanólico de <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 25 |
| Figura 6. Cromatograma das resinas glicosídicas obtidas. 1- Extrato Clorofórmico e 2- Extrato Metanólico.----- | 26 |
| Figura 7. Caracterização de açúcares no extrato clorofórmico. Cromatograma 1- Resíduo clorofórmico e 4-Glicose e Rhamnose respectivamente.----- | 27 |
| Figura 8. Cromatograma 1- Resíduo clorofórmico; 2- Amostra sem caramelo; 3- Amostra com caramelo e 4- Resíduo metanólico.----- | 28 |
| Figura 9. Caracterização de polifenóis no extrato metanólico ----- | 29 |
| Figura 10. Caracterização de açúcares no extrato metanólico. Cromatograma 1- Fase aquosa; 2- Rhamnose; 3- Glicose e 4- Fucose. ----- | 30 |
| CAPÍTULO III | |
| Figura 1. Curva de regressão linear obtida da média das três curvas de calibração autênticas----- | 46 |
| Figura 2. Visualização de Açúcares em Placa Cromatográfica de Gel de Sílica, eluída com Acetato de Etila/Propanol/Água (3,7:3,2:1,3) e revelada com Metaperiodato de Sódio/Benzidina ----- | 49 |
| CAPÍTULO IV | |
| Figura 11. Fluxograma de trânsito intestinal.----- | 52 |
| CAPÍTULO V | |
| Figura 12. Representação do processo de granulação por via úmida----- | 54 |
| Figura 13. Representação do processo de compressão direta ----- | 55 |
| Figura 14. Spray drying ----- | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO II | |
| Tabela 1. Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a abordagem fitoquímica de <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) urban ---- | 21 |
| Tabela 2. Metabólitos secundários encontrados no extrato metanólico da <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban ----- | 24 |
| Tabela 3. Representação da variação dos parâmetros para padronização dos extratos ----- | 32 |
| Tabela 4. Quantificação da resina de jalapa nas diferentes variáveis testadas ----- | 33 |
| CAPÍTULO III | |
| Tabela 1. Resultados da análise de variância para linearidade ----- | 46 |
| Tabela 2. Resultados da avaliação da robustez de acordo com ANOVA e teste <i>t</i> de <i>Student</i> ----- | 47 |
| Tabela 3. Resultados da Repetitividade ----- | 47 |
| Tabela 4: Resultados da Precisão Intermediária ----- | 48 |
| Tabela 5. Resultados do teste <i>t</i> de <i>Student</i> para Precisão Intermediária ----- | 48 |
| Tabela 6. Resultados da Exatidão do método ----- | 49 |
| CAPÍTULO IV | |
| Tabela 3: Composição dos lotes de bancada (LB) para definição do comprimido de jalapa 250 mg ----- | 59 |
| Tabela 4: Resultado do controle de qualidade dos lotes de bancada (LB) para os comprimidos de jalapa 250 mg ----- | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS.

% - percentagem

°C – Graus centígrados

µm – Micrômetro

AcOEt – Acetato de etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD – Cromatografia em camada delgada

CV – coeficiente de variação

g – Grama

gl – Graus de liberdade

h – Hora

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

Kg – Quilograma

Kgf/cm² - kilografa força por centímetro quadrado

LB – Lote de bancada

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MeOH – Metanol

mg – miligrama

min - minuto

mL- mililitro

mm - milimetro

MQ – Média quadrática

SQ – Soma Quadrática

TTZ – Cloreto de 2,3,5, Trifeniltetrazólio

v/v – volume/volume

RESUMO

A *Operculina macrocarpa* (L.) Urban é uma Convolvulaceae anual, com hábitos de trepadeira, distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A jalapa é encontrada em regiões compreendidas entre Antilhas e o Brasil, dentre as várias utilizações populares, as mais frequentes são como laxante e purgativo em prisão de ventre e constipação crônica. A constituição química de Convolvulaceae é definida por dois grupos resinosos principais, um deles solúvel em éter, denominado de jalapina e outro, mais polar, ainda pouco estudado, denominado de convolvulina. Ainda fazem parte da constituição das resinas outros compostos orgânicos e inorgânicos. Este trabalho compreende estudos farmacológico e de bioatividade, padronização do extrato, desenvolvimento e validação de uma metodologia de doseamento para o extrato de Jalapa e desenvolvimento da forma farmacêutica comprimido. No estudo fitoquímico constatou-se a presença de polifenóis, triterpenos, açúcares, além da resina. O extrato em estudo não apresentou: alcalóides, taninos hidrolisáveis, monoterpênicos (iridóides), protoantocianidinas e saponinas. Os resultados obtidos no ensaio da avaliação da atividade laxante demonstraram um aumento significativo da motilidade intestinal dos camundongos na dose de 250 mg/kg quando comparado ao grupo de camundongos que recebeu a dose de 125mg/Kg e equivalente aos resultados obtidos com o grupo de camundongos tratado com bisacodil 5mg. Os resultados obtidos na validação foram tratados estatisticamente por Análise de Variância *one-way* (ANOVA) e teste *t* de *Student*. O método demonstrou atender aos requisitos de Boas Práticas em laboratórios exigidos pela legislação brasileira em vigor, RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo, portanto, sensível, exato e preciso para o doseamento do extrato de Jalapa do Brasil. Foram estudadas duas formulações, uma contendo princípio ativo, celulose 250, estearato de magnésio e glicolato, a outra, substituindo o glicolato pela croscarmelose. Os resultados obtidos com os testes físicos preliminares de dureza, peso médio, friabilidade e tempo de desintegração, demonstraram que os comprimidos encontram-se dentro das especificações.

ABSTRACT

The *Operculina macrocarpa* (L.) Urban is an annual Convolvulaceae, with climbing plant habits, distributed mainly in tropical and subtropical regions. Jalap is found in regions understood between Antilhas and Brazil, amongst the some popular uses, most frequent is as laxative and purgative in arrest of womb and chronic constipation. The chemical constitution of Convolvulaceae is defined by two main resinous groups, one of them soluble in ether, called jalapina and other, more polar, still little studied, called convolvulina. Still other organic and inorganics composites are part of the resins constitution. The present work was conducted in order to study the pharmacochimistry, bioactivity, the extract standardization, development and validation of an extract of Jalapa assay methodology to obtain a compressed pharmaceutical form (tablets). The phytochemical study showed the presence of polyfenoids, triterpenoids, sugars, beyond the resin. However, it was not verified the presence of alkaloids, tannins, monoterpenoids (iridoids), protoantocianidines. The assay results of the evaluation at the laxative activity had demonstrated a significant increase in the mice intestinal motility treated about 250 mg/kg when compared with the mice group that received treated about 125mg/Kg and, equivalent results showed with the mice group treated with bisacodil 5mg. The results gotten in the validation had been dealt with by Analysis Variance one-way (ANOVA) and has estatistical tested t of Student. The method is in agreement with the Good Manufacture Practice requirements for laboratories demanded for the Brazilian legislation, RE n° 899 de 29 de maio de 2003 of the National Agency of Sanitary Vigilance, being, therefore, sensible, accurate Monitoring and precise for the assay at Jalap of Brazil extract. Two formulations had been studied, one with the raw material, cellulose 250, magnesium stearate and glicolate, and another one, substitute the glicolate for croscarmelose. The results showed with the preliminary physical tests of hardness, average weight, friability and disintegration, had demonstrated that the tablets meet inside of the specifications.

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO

O uso das plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto a própria humanidade. O conhecimento desse uso deve ter sido obtido a partir de duas maneiras básicas: a experimentação, de onde deve ter sido originado também diversos alimentos, mas também por instinto, isto é, uma forma de relacionamento homem- natureza não racional. A favor da inclusão dessa segunda forma citada, encontram-se os fatos de diversos animais silvestres procurarem remédios em plantas, como se soubessem racionalmente de seu valor terapêutico (GRAVES, 1945).

As sociedades pré-históricas foram gerando gradativamente essas informações, que se acumularam e surgiram escritas nas sociedades posteriores. Diversos artigos relatam listas de plantas medicinais constantes de farmacopéias ligadas a determinadas culturas (THOMSON, 1981). A falta de minerais eficazes e da incipiência da pesquisa química fez as plantas medicinais chegarem ao final do século XIX como a principal fonte de medicamentos da terapêutica da época (HARBONE, 1972).

O desenvolvimento da indústria, nascida da expansão das farmácias do século XIX, começa a reverter o costume da manipulação pelas especialidades farmacêuticas. Neste período, ainda predominavam as plantas, agora produzidas industrialmente com tecnologia simples, mas equivalente a das outras indústrias, mesmo multinacionais (FRENKEL et al, 1978).

Atualmente, pode-se afirmar que a fitoterapia nasceu próxima ao ser humano em função das suas necessidades básicas, compondo um verdadeiro acervo histórico-cultural do qual usufruímos até hoje (STASI, 1995).

Seu declínio, aceitação e uso decorrem do surgimento de produtos qualitativamente melhores, que vieram a ocupar adequadamente as lacunas que os fitoterápicos não preenchiam. Já o seu retorno não foi motivado pela própria fitoterapia, mas pelo conjunto de fatores político-sociais e culturais que forjaram a contra-cultura em todo mundo (STASI, 1995).

A fitoterapia é uma medicina tradicional, isto é, tem como origem ancestral em diversas culturas. Seu uso tem sido regular e constante por centenas de gerações, que transmitem o conhecimento de uma geração a outra. Este caráter tradicional lhe imprime o aspecto de forte integração social que facilita sua aceitação e adesão terapêutica contribuindo ao sucesso pretendido no tratamento (SIMOES, 1995).

Operculina macrocarpa (L.) Urban (Convolvulaceae) é uma trepadeira de aspecto ornamental, caule quadrangular, avermelhado e glabro. Folhas longo-pecioladas, grandes, de lobos agudos. Flores de corola branca, infundibuliformes, axilares, solitárias (BRAGA, 1976), cujas raízes são tuberosas, amiláceas e resiníferas. Espécie anual, que apesar de suas características silvestres pode ser cultivada com facilidade a partir de sementes ou do próprio tubérculo. Os tubérculos adultos são arrancados, cortados transversalmente em fatias estreitas que são postas a secar ao sol. Estas são comercializadas às toneladas sob o nome de aparas de batata (MATOS, 1998), Conhecida popularmente como: Jalapa do Brasil, batata de purga, xalapa, Jalapa de São Paulo, Purga do Amaro Leite, Ipu e Briônia da América (CRUZ, 1980).



Figura 1 e 2. Inflorescência e hábito de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban.

Tal espécie é encontrada em regiões compreendidas entre as Antilhas e o Brasil, além de regiões temperadas dos Andes Mexicanos entre 1500 e 2000 metros de altitude em áreas lamacentas e de solo profundo. O principal centro de comércio deste vegetal era feito na cidade mexicana de Jalapa, de onde originou sua sinonímia mais conhecida. Na Europa é encontrada em algumas regiões, porém, as condições climáticas são desfavoráveis (PLANCHON, 1937).

Decoctos e infusos dos tubérculos são purgativos. Atuando ainda como depurativo do sangue e na leucorréia, diarréia, desintéria, fraqueza geral, bem como na qualidade de preventivo da diarréia infantil que costuma verificar-se no período de dentição. Essa planta tem também a propriedade de regularizar a menstruação (CRUZ, 1980).



Figura 3 e 4. Tubérculos de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban.

A raiz encerra açúcar, sais, fécula, extrato gomoso e uma resina, dura, quebradiça, acastanhada. (BRAGA, 1976). Foram identificados dois grupos resinosos principais: um solúvel em éter chamado jalapina e outra mais polar, não solúvel em éter chamado convolvulina. Fazem parte ainda da constituição amido, saponina, manitol, ácidos graxos e outros compostos orgânicos e inorgânicos (SHELLARD, 1961).

2.OBJETIVOS

2.1Objetivo Geral

Padronização do extrato e desenvolvimento da forma farmacêutica comprimido utilizando a Jalapa do Brasil(*Operculina macrocarpa* L.)

2.2Objetivo Específicos

- Identificação bôtanica
- Padronização do extrato
- Avaliação da atividade laxante do extrato
- Estudo de pré-formulação
- Desenvolvimento da forma farmacêutica comprimido
- Validação da metodologia analítica para determinação do teor de matéria-prima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA R., **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**, 3° ed, Fortaleza, 1976, p. 76-77.

CRUZ GL. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 4 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1980 p. 104-105.

FRENKEL, J. **Tecnologia e competição na indústria farmacêutica brasileira**. Rio de Janeiro, FINEP, 1978.

GRAVES, A.H. **Breve resumo histórico do uso das plantas na medicina**. *Revista da Flora Medicinal*, 12 (2), p.43-65, 1945.

HARBONE, J.A. **Phytochemical ecology**. London, Academic Press, 1972.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**, 3° ed. Fortaleza, 1998, p. 79-81.

PLANCHON L, BRETIN P 1937. **Précis de Matière Médicale**. Paris: Librairie Maloine, p.1224-1235.

SHELLARD EJ 1961. **The chemistry of some convolvulaceous resins**. I Vera Cruz Jalap. *Chelsea Coll Sci & Technol. Plant Med* 9, p. 102-116.

SIMOES, C.M.O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora da universidade, 1995.

STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, UNESP, 1995.

THOMSON, W.A.R. **Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales**. Barcelona, Blume, 1981.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

2.1. ABORDAGEM FITOQUIMICA DE *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

2.1.1. INTRODUÇÃO

A família Convolvulaceae compreende 51 gêneros de ampla distribuição nos trópicos e subtropicais de todo mundo. São plantas em geral trepadeiras, podem ser herbáceas anuais ou fortemente lenhosas e então duradouras, como a maioria dos cipós das matas africanas (JOLY,1975). A literatura pertinente às características farmacológicas de *O. macrocarpa*, assim como, da maioria de representantes das Convolvulaceae é ainda incipiente, daí a necessidade de se confirmar os poucos relatos existentes na literatura.

2.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Indivíduos de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban foram coletados no município de São José de Espinharas, no estado da Paraíba, numa vegetação de caatinga situada nas coordenadas: 06°50'50''S e 37°19'33''W. O material botânico foi identificado pela Dr^a. Maria Bernadete Costa e Silva, mantendo-se a exsicata sob número 66300 no Herbário Dárdano de Andrade Lima (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA).

DROGAS E REAGENTES

- β - Amirina P.A. (MERCK)
- β - Sitosterol P.A. (MERCK)
- Acetato de etila P.A. (MERCK)
- Ácido acético P.A. (MERCK)
- Ácido clorídrico P.A. (REAGEN)
- Ácido gálico P.A. (MERCK)
- Ácido sulfúrico P.A. (MERCK)
- Água destilada

- Anidrido acético P.A. (MERCK)
- Anisaldeído (Fluka)
- Benzeno P.A. (MERCK)
- Benzidina (MERCK)
- Butanol P.A. (MERCK)
- Cloreto de 2,3,5, trifeniltetrazólio P.A. (Fluka)
- Clorofórmio P.A. (MERCK)
- D (+) – glicose P.A. (MERCK)
- Etanol P. A. (MERCK)
- Éter P.A. (MERCK)
- Metanol P.A. (MERCK)
- Metaperiodato de Sódio (MERCK)
- Propanol P. A. (MERCK)
- Quempferol P.A (MERCK)
- Quercetina P.A (MERCK)
- Saponina (MERCK)
- Vanilina P.A. (CARLO ERBA)

EQUIPAMENTOS

- ✓ Balança de precisão GEHAKA mod. BG 1000
- ✓ Balança Semi analítica FILIZOLA mod. p/ 5kg
- ✓ Bomba de vácuo
- ✓ Câmara fotográfica Nikon Coolpix 7900
- ✓ Câmara Ultravioleta(250 – 365nm) CHOMATO VUE
- ✓ Estufa Precision Thelco Model 18
- ✓ Rotavapor BUCHI INSTRUMENTS 5060 – CV

OUTROS

- ✓ Borrifadores para revelação em CCD
- ✓ Cubas cromatográficas para CCD
- ✓ Placas cromatográficas MERCK Art.
- ✓ Tubos de ensaio

Tabela 1. Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a abordagem fitoquímica de *Operculina macrocarpa* (L.) urban.

| METABÓLITO | SISTEMA DE ELUIÇÃO | REVELADOR | REFERÊNCIA |
|--|---|------------------------|--|
| Alcalóides | AcOEt – N-PrOH – H ₂ O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v) | Dragendorff | (WAGNER, 1996) |
| Monoterpenóides, Sesquiterpenóides Diterpenóides | e Benzeno – AcOEt (97 : 3 v/v) | Vanilina sulfúrica | (WAGNER, 1996) |
| Triterpenóides | e AcOEt – C ₇ H ₈ (20 : 80 v/v) | Liebermann Burchard | (SHARMA, 1991) |
| Esteróides | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | Vanilina sulfúrica | (HARBONE, 1998) |
| Iridóides | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 27 v/v) | Anisaldeído | (WAGNER, 1996) |
| Saponinas | AcOEt – N-Propanol – H ₂ O (5,7: 3,2: 1,3 v/v) | Trifeniltetrazólio | (WALLENFELS, 1950) |
| Açúcares redutores | Éter-tolueno-AcOH 10 % (50 : 50 : 50 v/v) | U.V. | (WAGNER, 1996) |
| Cumarinas | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | NEU | (WAGNER, 1996) |
| Derivados cinâmicos | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | NEU | (WAGNER, 1996) |
| Fenilpropanoglicosídeos | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | NEU | (WAGNER, 1996) |
| Flavonóides | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | NEU | (MARKHAM, 1982) (HARBORNE, 1998) |
| Proantocianidinas Condensadas | e AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | Vanilina Clorídrica | (ROBERTSON, 1955) |
| Leucoantocianidinas | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 2 : 2 : 2 v/v) | NEU | (XAVIER, 2001) |
| Ácido Gálico | AcOEt – HCOOH – AcOH – H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) | NEU | (XAVIER, 2001) |
| Taninos hidrolizáveis | | | |

2.1.3. MÉTODOS

PESQUISA DE ALCALÓIDES

Revelando-se o cromatograma com o reagente de Dragendorff, a presença de manchas de coloração alaranjada intensa foi usada como critério para acusar a existência de alcalóides.

PESQUISA DE MONOTERPENÓIDES, SESQUITERPENÓIDES E DITERPENÓIDES

Revelando-se o cromatograma com vanilina sulfúrica e aquecimento em estufa (100⁰C, durante 5 minutos), o surgimento de manchas com coloração azul escura foi usado como critério de evidência de monoterpénóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, consoante os valores de Rf apresentados.

PESQUISA DE TRITERPENÓIDES E ESTERÓIDES

Empregando-se padrões de β -amirina e β -sitosterol, após aplicação do reagente de Liebermann Buchard procedeu-se aquecimento em estufa (100⁰C, durante 5 minutos). Realizando-se uma visualização no visível e em câmara de UV (365 nm). O surgimento de manchas com coloração levemente rósea a avermelhada foi usando como critério para assegurar a presença de triterpenóides e esteróides.

PESQUISA DE IRIDÓIDES

Empregando-se padrão de ipolimida, o cromatograma foi revelado com vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento em estufa (100⁰C, durante 5 minutos). O surgimento de manchas com coloração violeta foi usado como critério de evidência de iridóides.

PESQUISA DE SAPONINAS

Empregando-se saponina padrão MERCK, revelando-se com anisaldeído, seguida de estufa (100⁰C, durante 5 minutos). O surgimento de manchas com coloração verde escura foi interpretado como resultado positivo para saponinas.

PESQUISA DE CUMARINAS

Observando-se em câmara de UV (365 nm), manchas de fluorescência azul foram usadas como critério de evidência de cumarinas.

PESQUISA DE DERIVADOS CINÂMICOS

Manchas de fluorescências tenuamente azuladas no UV (365 nm), após revelação com o reagente de NEU, e nova observação no UV (365 nm), apresentando-se então com fluorescência azul intensa foram usadas como indicativo da presença de derivados cinâmicos.

PESQUISA DE FENILPROPANOGLICOSÍDEOS

Manchas de fluorescências tenuamente azuladas no UV (365 nm), após revelação com o reagente de NEU, e nova observação no UV (365 nm), apresentando-se então com fluorescência verde-limão foram usadas como indicativo da presença de fenilpropanoglicosídeos.

PESQUISA DE FLAVONÓIDES

Revelando-se com reagente NEU, procedendo-se à observação em câmara de UV (365 nm). Manchas de fluorescência alaranjada (às vezes vermelha), amarela ou verde foram usadas para atestar a presença de flavonóides.

PESQUISA DE PROANTOCIANIDINAS CONDENSADAS E LEUCOANTOCIANIDINAS

A presença de manchas de coloração vermelha após revelação com vanilina clorídrica e visualização no visível foi usada como critério determinante da existência de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas.

PESQUISA DE ÁCIDO GÁLICO

Alíquotas do extrato metanólico foram co-cromatografado com padrão de ácido gálico, através de CCD. Manchas de fluorescência azul (UV 365 nm) quando reveladas com NEU foram usadas como critério da presença de ácido gálico.

PESQUISA DE TANINOS HIDROLIZÁVEIS

A presença de taninos hidrolizáveis foi investigada obedecendo a uma modificação do protocolo proposto por Stiasny (STIASNY, 1912).

PESQUISA DE AÇÚCARES REDUTORES

Empregando-se glicose como padrão e revelando-se o cromatograma com cloreto de 2,3,5, trifeniltetrazólio, após aquecimento em estufa (100⁰C, durante 5 minutos). O surgimento de manchas com coloração vermelha foi interpretado como resultado positivo à presença de açúcares redutores.

2.1.4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os ensaios fitoquímicos nos permitiram constatar a presença de: triterpenóides e esteróides, cumarinas e açúcares.

O extrato não apresentou, nas condições analíticas empregadas: alcalóides, ácido gálico, protoantocianidinas, iridóides, saponinas e glicosídeos cardíacos.

Os resultados obtidos pela prospecção fitoquímica podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Metabólitos secundários encontrados no extrato metanólico da *Operculina macrocarpa* (L.) Urban.

| METABÓLITOS | EXTRATO |
|---|---------|
| Alcalóides | - |
| Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides | - |
| Triterpenóides e Esteróides | + |
| Iridóides | - |
| Saponinas | - |
| Açúcares redutores | + |
| Cumarinas | + |
| Derivados cinâmicos | - |
| Fenilpropanoglicosídeos | - |
| Flavonóides | - |
| Proantocianidinas Condensadas e Leucoantocianidinas | - |
| Ácido gálico | - |
| Taninos hidrolizáveis | - |

Expressão dos resultados: (+) = positivo; (-) = negativo.

2.2. OBTENÇÃO DE RESINAS GLICOSÍDICAS A PARTIR DO PÓ DE *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

2.2.1. MÉTODO

Obedecendo a um protocolo determinado por Noda *et al* (1987) tubérculos (300g) secos e pulverizados, foram extraídos separadamente e exaustivamente com aumento de polaridade hexano (EH), clorofórmio (EC) e metanol (EM), sucessivamente em temperatura ambiente (48 horas para cada solvente). Em adição os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40° C.



Figura 5. Balão contendo resíduo metanólico de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban.

2.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos respectivamente dos extratos clorofórmico e metanólico, seus resíduos correspondentes para a obtenção de resinas glicosídicas. Sendo este último lavado com água destilada para obtenção de um precipitado castanho, cujo rendimento foi de 3,5 g.

Para comprovação da existência de resinas glicosídicas nos dois resíduos, efetuamos inicialmente uma análise cromatográfica (gel de sílica MERCK Alemanha, art 105554) empregando-se como fase móvel a mistura constituída por acetato de etila: propanol: água (5,7: 3,2: 1,5 v/v), revelando-se o cromatograma com metaperiodato de sódio/benzidina e cloreto de trifeniltetrazólio (TTZ), de forma a caracterizar os açúcares redutores e não redutores por ventura presentes.

O cromatograma correspondente às amostras do extrato clorofórmico e metanólico (figura 6) quando revelado com metaperiodato/ benzidina mostrou que apenas a amostra deste último contém açúcares que reagem facilmente com o reagente (hidroxilas vicinais). Como este procedimento não invalida a existência de açúcares redutores também presentes no extrato clorofórmico, um cromatograma semelhante foi efetuado revelando-se com TTZ. Com este revelador obteve-se um cromatograma onde a amostra do resíduo clorofórmico mais uma vez não mostrou reação positiva para açúcares (figura 7).

Os componentes do resíduo metanólico são facilmente perceptíveis quando usamos o sistema e os reveladores já citados.



Figura 6. Cromatograma da resina glicosídica obtida. 1- Extrato Clorofórmico e 2- Extrato Metanólico.

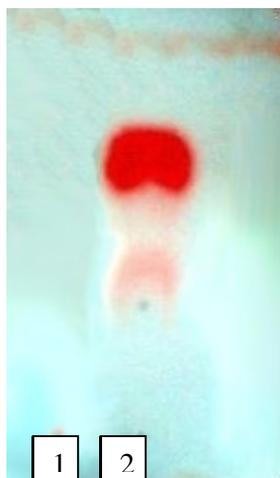


Figura 7. Caracterização de açúcares no extrato clorofórmico. Cromatograma 1- Resíduo clorofórmico e 2-Glicose e Rhamnose respectivamente.

Sistema: Acetato de etila/Propanol/Água (5,7:3,2:1,3 v/v). Revelador: Cloreto de trifeniltetrazólio TTZ.

2.3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A AMOSTRA DE AGUARDENTE ALEMÃ E O RESÍDUO METANÓLICO OBTIDO.

A tintura de Jalapa foi introduzida na terapêutica por Cadet de Gassicourt quando retornou de incursões efetuadas na Moravia e Baviera (1809), daí o nome de aguardente alemã (eau-de-vie allemande) (GORIS, 1949).

2.3.1. MATERIAL

Foram fornecidas duas amostras da Aguardente Alemã (tintura de *O. macrocarpa*) produzidas pelo Laboratório Sobral no Piauí: uma contendo o extrato hidroalcoólico e caramelo, que entra na formulação como edulcorante, e outra isenta do caramelo.

2.3.2. MÉTODO

Uma alíquota de 400 mL de Aguardente Alemã, contendo caramelo, foi submetida a evaporação sob pressão reduzida à temperatura de 40° C, para eliminação do solvente, obtendo-se um resíduo castanho-amarelado. Este foi pré-purificado lavando-se com água destilada, seguindo-se de filtração a vácuo.

2.3.3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Obteve-se um resíduo castanho-amarelado cujo rendimento foi de 5,58 g.

Comparando o cromatograma contendo a amostra do resíduo metanólico e as amostras fornecidas pelo Laboratório Sobral, constatou-se a presença de resinas glicosídicas equivalentes às daquelas do resíduo metanólico (figura 8).



Figura 8. Cromatograma 1- Resíduo clorofórmico; 2- Amostra sem caramelo; 3- Amostra com caramelo e 4- Resíduo metanólico.

Sistema: Acetato de etila/Propanol/Água (5,7:3,2:1,3 v/v). Revelador: Metaperiodato de sódio 0,1%/Benzidina.

2.4. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLIFENÓIS NO EXTRATO METANÓLICO

Visando conhecer melhor as características do extrato metanólico, no que concerne a presença ou ausência de polifenóis, efetuamos uma análise cromatográfica de uma amostra do mesmo.

2.4.1. MÉTODOS

Preparação do Extrato Metanólico

Tubérculos secos e pulverizados (3 g), foram submetidos a uma infusão metanólica, mantendo-se uma agitação constante durante 2 horas.

A análise Cromatográfica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) em Sílica Gel (Merck Alemanha 105553) desenvolvida pela combinação dos solventes Acetato de etila/Ácido Acético/Ácido Fórmico/Água (100:11:11:26 v/v) e NEU, como revelador.

2.4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

À luz do cromatograma obtido constatou-se que o extrato metanólico apresentava manchas correspondentes a derivados cinâmicos e cumarinas (estas visíveis no ultravioleta 365 nm, sem a necessidade de revelador). Conforme figura 9.

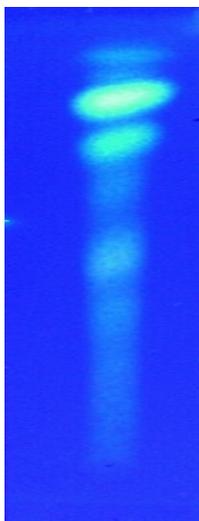


Figura 9. Caracterização de polifenóis no extrato metanólico

2.5. HIDRÓLISE ÁCIDA DOS EXTRATOS METANÓLICO E CLOROFÓRMICO DA *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

Para constatar o conteúdo de resinas glicosídicas presentes nos tubérculos, um ensaio hidrolítico foi efetuado, sendo os hidrolisados analisados por cromatografia em camada delgada de forma a por em evidência os açúcares presentes.

2.5.1. MÉTODOS

Adicionou-se 50 mL de 1,4 dioxano/H₂O (1:1v/v) com 150 mg da resina (obtida por precipitação de extrato metanólico, com água), e 40 mL de H₂SO₄, mantendo-se sob refluxo com agitação constante durante 3 horas. O hidrolisado foi tratado com Carbonato de Bário (BaCO₃), para se eliminar a acidez. Particionando-se em seguida o hidrolisado com éter dietílico, sendo a fase aquosa submetida à análise cromatográfica (gel de sílica MERCK Alemanha, art 105554),

empregando-se como fase móvel a mistura constituída por acetato de etila: propanol: água (5,7: 3,2: 1,5 v/v), revelando-se o cromatograma com cloreto de trifeniltetrazólio TTZ.

Adicionou-se 8 mL de 1,4 dioxano/H₂O (1:1) com 25 mg da resina do extrato clorofórmico concentrado e 7 mL de H₂SO₄, mantendo-se sob refluxo com agitação constante durante 3 horas. O hidrolisado foi tratado com Carbonato de Bário (BaCO₃), para se eliminar a acidez. O resíduo alcalinizado foi submetido à análise cromatográfica (gel de sílica MERCK Alemanha, art 105554) empregando-se como fase móvel a mistura constituída por acetato de etila: propanol: água (5,7: 3,2: 1,5 v/v), revelando-se o cromatograma com cloreto de trifeniltetrazólio TTZ.

2.5.2.RESULTADO E DISCUSSÃO

O cromatograma contendo fase aquosa do hidrolisado e os padrões de rhamnose, glicose e fucose, mostrou que a glico-resina da *Operculina macrocarpa* contém essencialmente rhamnose e glicose.

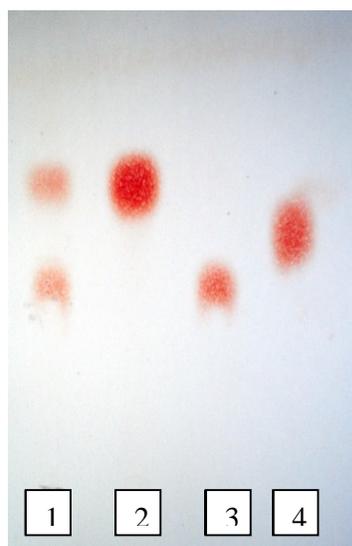


Figura 10. Caracterização de açucares no extrato metanólico. Cromatograma 1- Fase aquosa; 2- Rhamnose; 3- Glicose e 4- Fucose.

Sistema: Acetato de etila/Propanol/Água (5,7:3,2:1,3 v/v). Revelador: Cloreto de trifeniltetrazólio TTZ.

Enquanto o cromatograma de resíduo clorofórmico da *Operculina macrocarpa*, não foi positivo para os açúcares: rhamnose, glicose e fucose

2.6.CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela prospecção fitoquímica foram positivos para triterpenóides e esteróides, açúcares redutores e cumarinas.

O conteúdo de resina glicosídica em *Operculina macrocarpa* deve-se a moléculas de polaridade elevada, solúveis em metanol. Sendo estas constituídas por glico-resinas cujos açúcares são predominantemente glicose, rhamnose e fucose. A jalapina, supostamente contida no resíduo clorofórmico não foi encontrada.

2.7.PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS

2.7.1.MÉTODO

DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DO PÓ

Parte da amostra de pó bruto foi submetido à vibração no aparelho de repartição granulométrica utilizando um conjunto de tamizes com as seguintes aberturas de malhas (75;150;180;250;425;600 mm/ μ m) seguindo procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira 4ed.

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados utilizando-se 50g de amostra, 250mL de solução hidroalcoólica, porém variando: tempo de maceração (24 horas, 7dias, 14 dias), as proporções de água e etanol na solução hidroalcoólica (50%, 20:80% água/etanol, 20:80% etanol/água) e a granulometria onde foram selecionadas as características de partição para o pó (pó fino + pó finíssimo, pó moderadamente fino, pó moderadamente grosso) segundo Farmacopéia Brasileira 4ed, 1988, conforme tabela 3.

Tabela 3. Representação da variação dos parâmetros para padronização dos extratos

| Extratos | Quantidade de pó(g) | Granulometria | Solução Hidroalcoólica (250 mL) | Tempo de maceração |
|----------|---------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 50 | Pó bruto | 50% | 24 horas |
| 2 | 50 | Pó bruto | 50% | 7 dias |
| 3 | 50 | Pó bruto | 50% | 14 dias |
| 4 | 50 | Pó bruto | 20 – 80 Água/etanol | 7 dias |
| 5 | 50 | Pó bruto | 80 – 20 Água/etanol | 7 dias |
| 6 | 50 | Pó fino + pó finíssimo | 50% | 7 dias |
| 7 | 50 | Pó moderadamente fino | 50% | 7 dias |
| 8 | 50 | Pó moderadamente grosso | 50% | 7 dias |

A quantificação da resina foi obtida utilizando a metodologia analítica descrita na Farmacopéia Brasileira 1ª ed., onde misturou-se 20mL do extrato num funil de separação com 10 mL de clorofórmio, adicionou-se 12g de citrato de potássio em 12 mL de água, agitando bem. Quando as duas fases estavam separadas completamente após 12 horas de repouso, a camada inferior foi desprezada e filtrou-se a camada superior para uma cápsula tarada, o funil foi lavado com uma mistura de 5mL de clorofórmio com 10mL de álcool e adicionado ao conteúdo da cápsula. Foi evaporado em banho maria e em seguida levado a estufa para secar a 100°C, até peso constante.

Este resíduo deveria pesar no mínimo 0,2g, o que corresponderia a um mínimo de 10% da resina.

2.7.2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos foram analisados segundo a metodologia descrita. Os resultados foram tratados a partir da média da triplicata das análises. Ao analisar todas as variáveis testadas

concomitantemente, estas não apresentaram diferenças relevantes no parâmetro discriminativo que é o teor de resina, conforme descrito na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Quantificação da resina de jalapa nas diferentes variáveis testadas

| Amostras | Teor de resina (%) |
|----------|--------------------|
| 1 | 21,5 |
| 2 | 19,34 |
| 3 | 19,17 |
| 4 | 18,87 |
| 5 | - |
| 6 | 19,5 |
| 7 | 18,67 |
| 8 | 16,52 |

Variando o tempo de extração (24 h, 7 dias e 14 dias) podemos concluir que uma redução no número de horas não implica em diferenças significativas no teor de resina dos extratos. Sendo assim, fazendo uma transposição para escala industrial, o tempo de processo, o qual inclui o tempo de extração, é um fator que implica diretamente no custo do produto final. Também deve ser considerado que um processo de extração demorado pode ocasionar outros problemas, como ser o extrato passível de contaminação microbiológica, apesar de sua composição ser hidroalcoólica (50:50;v/v). Constatou-se que não existe diferença significativa entre os teores de resina quando comparamos o extrato 1, contendo pó bruto (que não foi submetido ao processo de partição granulométrica) com os extratos 6 e 7. O extrato 8 apresentou um teor de resina inferior aos demais sendo excluído do estudo comparativo.

Analisando a variável, proporções de água e etanol na solução hidroalcoólica, observou-se que a escolha do extrato utilizando solução hidroalcoólica (50:50;v/v) promoveria uma redução dos custos do processo, uma vez que, não existe diferenças significativas entre o extrato mencionado e o extrato utilizando uma maior proporção de etanol. O extrato 5 não apresentou partição de fases.

Partindo destas considerações e diante dos resultados obtidos com as diferentes variáveis, o estudo prosseguiu com o extrato selecionado de jalapa sendo obtido passando pelo seguinte processo: partindo-se da matéria-prima (pó bruto), preparado em solução hidroalcoólica (50:50;v/v) e macerado durante 24h.

2.8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1ª ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926, p.535-536.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4ª ed., São Paulo: Atheneu Editora, 1988.

GORIS, A. LIOT, A., JANOT, M. M.. & GORIS, A. **Pharmacie Galénique**, 3ed. Tome I. Paris: Masson et cie editeurs, 1949, p. 915.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**, 3 ed., London: Chapman & Hall, p. 288, 1998.

JOLY A 1975. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p.574-576.

MARKHAN, K. R. **Techinques of flavonoid identification**. London: Acad. Press., p. 52-61, 1982.

NODA NM 1987, Resin Glycosides I. Isolation and Structure Elucidation of Orizabin-I, II, III and IV, Genuine Resin Glicosides from the root of Ipomoea Orizabensis. Tetrahedron Vol 43, n° 17, p. 3889-3902.

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R. A.; WOOD, J., **J. Sci. Food Agr.** v. 7, p. 637-640, 1956.

SHARMA, O. P., DAWRA, R. K. Thin-layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) plant. **J. Chrom.**, v. 587, p. 351-354, 1991.

STIASNY, E. **The qualitative and differentiation of vegetable tannins**. Collegium, p. 483-499, 1912

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas.** 2 ed. Berlin: Springer Verlag, p. 384, 1996.

WALLENFELS, K. Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. **Naturwissenschaften** v. 37, p. 491-492, 1950.

XAVIER, H. S. **Comunicação pessoal.** Recife, 2001.

CAPÍTULO III

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE
QUANTIFICAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE RESINA GLICOSÍDICA EM
FITOTERÁPICO CONTENDO OPERCULINA MACROCARPA(L.)
URBAN**

Luciana R. de Lima¹ , Haroudo S. Xavier² , Juliana L. Meira³ , Pedro J.Rolim Neto^{1*}

1-Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50740-521.

2 - Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE CEP 50740-521.

3 - Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50740-521.

3.1.RESUMO

O extrato de tubérculos de *Operculina macrocarpa* (Jalapa do Brasil) é um produto fitoterápico, com eficácia no tratamento de constipação, como laxante. A resina quantificada é extraída com solução hidroalcoólica apresentando constituintes orgânicos e inorgânicos, podendo ser dividida em duas frações principais: uma solúvel em éter, chamada de jalapina e outra, mais polar, ainda pouco estudada, denominada convolvulina. O interesse principal deste trabalho foi propor uma otimização da metodologia gravimétrica para doseamento da resina descrita na Farmacopéia Brasileira Primeira Edição e sua validação com o objetivo de diminuir os custos e o tempo de partição das fases. Os resultados obtidos na validação foram tratados estatisticamente por Análise de Variância *one-way* (ANOVA) e teste *t* de *Student*. O método demonstrou atender aos requisitos de Boas Práticas em laboratórios exigidos pela legislação brasileira em vigor, RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária, sendo, portanto, sensível, exato e preciso para o doseamento do extrato de *Operculina macrocarpa*, conhecida popularmente como Jalapa do Brasil.

Unitermos: Doseamento, Validação, *Operculina*, Jalapa do Brasil, Fitoterápico.

*Contato com o autor:

UFPE – DCFAR – LTM Fone/Fax:81-32721383

e-mail: prolim@ufpe.br; prolim@globo.com

3.2.ABSTRACT

The tubercle extract of *Operculina macrocarpa* (Jalap of Brazil) is a phytomedicine, with effectiveness in the treatment of constipation, as laxative. The quantified resin is extracted with hydro-alcoholic solution, presenting constituent organic and inorganic, being able to be divided in two main fractions: one soluble in ether, called jalapina and other, more polar, still little studied, called convolvulina. The main objective of this work was to consider the optimization of the gravimetric methodology for assay of the resin described in the Brazilian Pharmacopeia, First Edition and its validation, with the objective to diminish the costs and the partition time of the phases. The results achieved in the validation had been statistically treated by one-way Variance Analysis (ANOVA) and *t* test of *Student*. The method demonstrated to attend to the Good Manufacture Practice requirements for laboratories, demanded by actual brazilian law, RE n° 899 of May 29th of 2003 from the National Agency of Sanitary Vigilance, being therefore, sensible, accurate and precise for the assay of the *Operculina macrocarpa* extract, known popularly as Jalap of Brazil.

Keywords: Assay, Validation, *Operculina*, Jalap of Brazil, Phytomedicine.

3.3.INTRODUÇÃO

A *Operculina macrocarpa* (L.) Urban é uma Covelvulaceae anual, com hábitos de trepadeira, distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Fazem parte também

desta família as espécies do gênero *Ipomoea*, que produzem a conhecida raiz tuberosa de batata doce (Joly, 1975).

A jalapa é encontrada em regiões compreendidas entre Antilhas e o Brasil, além de regiões temperadas dos Andes Mexicanos, em regiões lamacentas e de solo profundo. (Planchon,1937). No Brasil é encontrada em vários estados recebendo assim diversas sinonímias populares, dentre as mais citadas na literatura estão: Batata de purga, Xalapa, Jalapa de São Paulo, Purga do Amaro Leite, Jalapa do Brasil (CRUZ, 1980).

Dentre as várias utilizações populares, as mais freqüentes são como laxante e purgativo em prisão de ventre e constipação crônica. Emprega-se também como depurativo do sangue e na leucorréia, diarreia, disenteria, fraqueza geral. Esta planta tem também a propriedade de regularizar a menstruação (CRUZ, 1980).

Classicamente a constituição química de Convolvulaceae é definida por dois grupos resinosos principais, um deles solúvel em éter, denominado de jalapina e outro, mais polar, ainda pouco estudado, denominado de convolvulina (NODA, 1987). Ainda fazem parte da constituição das resinas outros compostos orgânicos e inorgânicos (SHELLARD,1961).

É exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução (RDC N° 48, 2004), que regula os medicamentos fitoterápicos, que para efeito de registro, se faz necessário a elaboração de um relatório de controle de qualidade, incluindo análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie.

Sendo parte integrante da qualidade, a validação segundo normas da ANVISA (Resolução RE n° 899, 2003), tem como objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise, demonstrando que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. O uso de ferramentas estatísticas adequadas, tais como teste T Student e teste F, análise de variância, regressão linear entre outras, estão indicadas para demonstração dessa evidência objetiva da validade do método (BARROS, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia de doseamento para o extrato de Jalapa do Brasil a partir de método gravimétrico.

3.4.MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1.MATERIAL

Foram coletadas amostras de *Operculina Macrocarpa* em São José de Espinhais no Estado da Paraíba, numa vegetação de caatinga, situada nas coordenadas:06°50'50''S e 37°19'33''W. A responsável pela identificação da espécie foi a prof. Maria Bernadete Costa e Silva, a exsicata se encontra depositada no IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária) sob n° de registro:66.300.

O material utilizado foi o extrato hidroalcolico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*), Clorofórmio (Nuclear®); Citrato de potássio (Nuclear®) , Água destilada, Acetato de Etila (Nuclear®), Propanol (Merck®), Metaperiodato de sódio (Merck®), Benzidina (Merck®), Placas Cromatográficas de Gel de Sílica Merck.

3.4.2.MÉTODOS

Desenvolvimento da Metodologia

Preparação do extrato de Jalapa

Foram pesados 400 g de batata de purga secas e trituradas com tamanho de partícula entre 400 - 840µm e transferidas para um percolador de aço inox onde foi submetida a um processo de maceração por 24 horas utilizando 2000 mL de solução hidroalcolica 50%.

Este processo foi definido a partir de ensaios em diferentes condições, fazendo variar o tamanho de partículas, o tempo de maceração e a proporção de solução hidroalcolica.

O método gravimétrico (Farmacopéia Brasileira 1ª ed.,1926) determina que sejam tomados 20 mL de extrato e transferidos para um funil de separação, em seguida adiciona-se 10 mL de clorofórmio, 12 g de citrato de potássio e 12 mL de água destilada, agita-se vigorosamente e deixa em repouso por 12 horas. Ocorre uma separação em duas fases: uma clorofórmica (superior) e uma aquosa (inferior). A fase inferior é descartada e a fase superior é transferida para uma cápsula previamente tarada e concentrada em banho-maria. O resíduo é seco a 100°C até peso constante.

Foi desenvolvida uma metodologia na qual o citrato de potássio foi retirado e a fase quantificada passou a ser a inferior. Também foi viabilizada uma redução no tempo de partição das fases que passou de 12 para 2 horas sem redução na capacidade de partição das duas fases. Esta avaliação ocorreu a partir da observação da qualidade da partição em diferentes tempos.

Estudo da Validação

Os parâmetros avaliados foram a Robustez, Linearidade, Especificidade, Precisão, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Exatidão.

Linearidade

A linearidade foi avaliada através do tratamento dos dados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas, contendo cinco concentrações equivalentes a 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg/mL da resina de Jalapa.

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

Os limites de detecção e o de quantificação foram calculados pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares destas respectivas curvas e multiplicado por 3,0 e 10,0 respectivamente. (Resolução RE nº 899, 2003)

Robustez

A robustez do método avaliou as seguintes variáveis: presença ou ausência de citrato, presença ou ausência de luz e tempo de partição das fases. A avaliação dos resultados foi realizada através da análise de variância one-way (ANOVA) e teste t de Student.

Especificidade

Foi avaliada a partir da análise do placebo solução hidroalcoólica 50% em cromatografia de camada delgada, utilizando como fase móvel: acetato de etila/propanol/água (5,7:3,2:1,3), fase fixa: Placa Cromatográfica de Gel de Sílica Merck e substância reveladora: Metaperiodato de Sódio/Benzidina.

Precisão

A precisão foi avaliada nos níveis: repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada pela análise de seis amostras individuais (sextuplicata). A precisão intermediária foi determinada em dois dias por dois analistas diferentes.

A repetitividade foi expressa através do coeficiente de variação entre as amostras (CV) e a precisão intermediária, além do CV, foi avaliada pelo teste t de Student.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da análise de amostras em concentrações conhecidas do extrato de Jalapa equivalentes a 50, 100 e 150 % da concentração teórica analisada. Os resultados foram avaliados através do teste t de Student pareado, comparando-se os resultados em relação ao valor teórico definido para cada concentração analisada.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e para cada parâmetro avaliado foram preparadas curvas controles diárias com as concentrações de 5, 10 e 15 mg/mL.

3.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento da Metodologia

A partir do extrato fluido obtido e otimizado no processo, controlando-se as variáveis: tamanho de partícula, tempo de maceração e proporção da solução extrativa, foi desenvolvida e validada a metodologia analítica de tal maneira que o citrato de potássio, que tinha a função na metodologia de tornar a fase aquosa mais densa que a clorofórmica, foi retirado e a fase quantificada passou a ser a inferior.

O tempo de partição das fases (clorofórmica e aquosa) foi reduzido de 12 para 2 horas, na ausência de citrato.

A cápsula de porcelana e o banho-maria foram substituídos por placa de petri e chapa de aquecimento reduzindo, assim, o tempo de análise sem com isso prejudicar o teor do analito.

Com a retirada do citrato de potássio e a redução do tempo de partição, foram reduzidos os custos analíticos tornando a metodologia mais viável para aplicação na rotina industrial.

Linearidade

Para o parâmetro de linearidade, os resultados apresentados estão ilustrados (Figura 1) e demonstraram que o método é linear, tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 1,4867(\pm 0,0521)X - 1,2667 (\pm 1,1073)$, correlacionando concentração do extrato (X) e porcentagem de resina obtida (Y), onde $R^2 = 0,9935$, o que sugere que 99,35 % dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizado os resíduos.

A partir da análise de variância (Tabela 1) podemos verificar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. As análises de variância dos dados demonstraram que o método é linear, na faixa de concentração testada (5 – 15 mg/mL) e que não há falta de ajuste do modelo com 95% de confiança.

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

Os limites de detecção (1,2816 mg/mL) e de quantificação (1,9418 mg/mL) obtidos de acordo com o tratamento descrito na RE nº 899, ANVISA, mostram que o método é bastante sensível à resina.

Robustez

Os resultados da avaliação dos parâmetros da robustez foram avaliados por teste t de Student e análise de variância one-way e estão apresentados na tabela 2.

Como os valores calculados foram menores que os tabelados comprovou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre variáveis dos diferentes parâmetros analisados, com um intervalo de confiança de 95%.

Precisão

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados. A repetitividade realizada em sextuplicata com concentração a 100%, apresentou um coeficiente de variação (CV) de 4,43% inferior ao especificado pela Resolução vigente, que é de 5 % (Tabela 3).

Na precisão intermediária, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre analistas e dias diferentes, empregando-se o teste *t de Student*, com 95% de confiança, como observado nas Tabelas 4 e 5, onde o $t_{\text{calculado}}$ é inferior ao t_{tabelado} .

Especificidade

Na análise do placebo (solução hidroalcolica 50%), não foi detectada a presença de açúcares característicos da resina da Jalapa comprovando-se a especificidade do método (Figura 2).

Exatidão

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes (50%, 100%, 150%). Os resultados foram tratados pelo teste t de Student, o qual demonstrou que o tcalculado foi inferior ao tabelado comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios obtidos e os esperados das três concentrações analisadas, com um intervalo de 95% de confiança (Tabela 6). Para as concentrações de 50, 100 e 150%, foram encontrados os respectivos percentuais de recuperação: 51,67%, 103,5% e 153,33%.

3.6.CONCLUSÃO

O método apresentado foi desenvolvido e validado com a finalidade de disponibilizar uma metodologia alternativa para a quantificação da resina de *Operculina macrocarpa*. Os resultados obtidos mostram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório, pois apresenta a confiabilidade requerida para um método analítico.

Além de ser uma alternativa rápida, segura e de baixo custo para a rotina de uma indústria farmacêutica, evidencia a vital importância dessa ferramenta de qualidade no desenvolvimento de metodologias analíticas voltadas para a realidade de cada empresa no segmento de produtos fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo financiamento à CAPES, PRONEX, CNPq e ao Laboratório Industrial Farmacêutico Sobral.

3.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Resolução RE N° 899, ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 02/06/2003.

RDC N° 48, ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução, de 16 de Março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 18/03/2004.

BARROS CB 2002. **Validação de Métodos Analíticos, Biológico**. 64 (2): 175-177.

CRUZ GL 1980. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 4 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, p. 104-105.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1ª ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926, p.535-536.

JOLY A 1975. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p.574-576.

NODA NM 1987, **Resin Glycosides I. Isolation and Structure Elucidation of Orizabin-I, II, III and IV, Genuine Resin Glicosides from the root of Ipomoea Orizabensis**. Tetrahedron Vol 43, n° 17, p. 3889-3902.

PLANCHON L, BRETIN P 1937. **Précis de Matière Médicale**. Paris: Librairie Maloine, p.1224-1235.

SHELLARD EJ 1961. **The chemistry of some convolvulaceous resins**. I Vera Cruz Jalap. *Chelsea Coll Sci & Technol. Plant Med* 9, p. 102-116.

Tabela 1. Resultados da análise de variância para linearidade

| Fonte | SQ | gl | MQ | F | F-crítico |
|------------------------|----------|----|----------|------------------------|-----------|
| Modelo | 414,4083 | 1 | 414,4083 | 946,526 | 4,6672 |
| Residual | 5,6917 | 13 | 0,4378 | Curva linear | |
| Falta de ajuste | 2,6917 | 3 | 0,8972 | 2,9907 | 3,7083 |
| Erro puro | 3,0000 | 10 | 0,3 | Não há falta de ajuste | |
| Total | 420,1000 | 14 | 30,0071 | | |

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

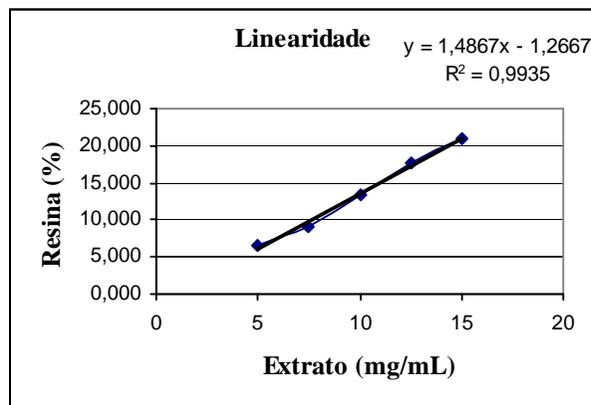


Figura 1. Curva de regressão linear obtida da média das três curvas de calibração autênticas.

Tabela 2. Resultados da avaliação da robustez de acordo com ANOVA e teste *t* de *Student*

| Parâmetros | Variáveis | Média | CV% | t cal | t crít | Fcal | Fcrít |
|------------|-----------|-------|------|-------|--------|-------|-------|
| LUZ | Ausência | 13,33 | 2,17 | 2,121 | 2,776 | - | - |
| | Presença | 12,83 | 2,25 | | | | |
| CITRATO | Ausência | 13,17 | 2,19 | 1,414 | 2,776 | - | - |
| | Presença | 12,83 | 2,25 | | | | |
| TEMPO | 12h | 13,5 | 3,7 | - | - | 1,185 | 4,066 |
| | 6h | 12,83 | 2,25 | | | | |
| | 3h | 13,17 | 4,38 | | | | |
| | 2h | 13,17 | 2,19 | | | | |

Tabela 3. Resultados da Repetitividade.

| Concentração (ppm) | | | | | | Média | D.P. | CV% |
|--------------------|----|------|------|----|----|-------|------|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| 13 | 13 | 14,5 | 13,5 | 14 | 14 | 13,67 | 0,61 | 4,43 |

Tabela 4: Resultados da Precisão Intermediária.

| Dias | Analistas | Concentração (%) | | | Média | CV% |
|------|-----------|------------------|------|------|-------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | | |
| 1º | I | 13 | 13,5 | 13,5 | 13,33 | 2,16 |
| | II | 13 | 13,5 | 14 | 13,5 | 3,70 |
| 2º | I | 14 | 14 | 13,5 | 13,83 | 2,09 |
| | II | 13 | 13 | 14 | 13,33 | 4,33 |

Tabela 5. Resultados do teste *t* de *Student* para Precisão Intermediária.

| | t calc | t crít |
|---------------------------|--------|--------|
| Analistas 1 e 2 no 1º dia | 0,500 | |
| Analistas 1 e 2 no 2º dia | 1,341 | |
| Analista 1 no 1º e 2º dia | 2,121 | 2,776 |
| Analista 2 no 1º e 2º dia | 0,377 | |



Figura 2. Visualização de Açúcares em Placa Cromatográfica de Gel de Sílica, eluída com Acetato de Etila/Propanol/Água (3,7:3,2:1,3) e revelada com Metaperiodato de Sódio/Benzidina.
 1. Placebo-solução hidroalcolica 50%
 2. Extrato hidroalcolico 50% de *Operculina macrocarpa*

Tabela 6. Resultados da Exatidão do método.

| Concentração | t calc | t crít |
|--------------|--------|--------|
| 50% | 1,256 | |
| 100% | 1,732 | 4,303 |
| 150% | 1,844 | |

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LAXANTE DA JALAPA DO BRASIL *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

4.1 INTRODUÇÃO

A *Operculina macrocarpa* (L.) Urban, conhecida popularmente como batata de purga, é uma espécie silvestre, mas pode ser facilmente cultivada pelo plantio das sementes ou mesmo dos tubérculos (MICHELIN,2004). Esses, quando adultos, são arrancados, cortados transversalmente em fatias estreitas, postas a secar no sol, sendo comercializadas sob o nome de aparas de batata (MATOS, 1982; MATOS, 1994).

A batata de purga é amplamente utilizada pela população devido à sua atividade laxante, purgativa, depurativa contra moléstias da pele e no tratamento da leucorréia (MARTINS et al, 2000). Exercendo sua ação purgativa no intestino delgado, aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação, podendo ser classificada como um laxante estimulante drástico. Esta ação é devido ao elevado teor de resina presente no tubérculo. Esta resina tem na sua constituição glicosídeos, os quais na presença da bile hidrolisam-se em açúcar e aglicona, liberando o ácido graxo livre correspondente. Os ácidos graxos livres irritam a mucosa intestinal, aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação (TESKE & TRENTTINI,1997, PEREDA & BAH, 2003).

A velocidade do trânsito intestinal é um dos fatores que determina a intensidade de absorção do conteúdo luminal e regula a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Por esta razão, a medida da velocidade do trânsito é etapa obrigatória no estudo de novos medicamentos. Serve também para a pesquisa de compostos inibitórios ou estimulantes da atividade peristáltica (LAPA et al, 2003).

A pesquisa farmacológica de plantas medicinais tem propiciado não só avanços importantes para a terapêutica de várias patologias, como também tem fornecido ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico de fisiologia e farmacologia (STASI, 1995).

Este trabalho tem como objetivo a avaliação do trânsito intestinal em camundongos do extrato hidroalcolico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas com 45 dias de idade, pesando entre 25 e 35 g, sendo adaptadas ao biotério experimental, por 5 dias, antes do início dos ensaios. Os camundongos tinham livre acesso à alimentação e água. No dia do experimento foram mantidos em jejum por 16 horas e receberam água *ad libitum*.

MATERIAL

Câmara anestésica, cânula de gavagem para camundongo, seringa de 1 mL, régua, material cirúrgico: pinça dente de rato, tesoura de ponta grossa.

Drogas e reagentes: Éter, Atropina, Carvão ativado, Bisacodil 5 mg, Extrato hidroalcoólico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*).

MÉTODO

PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE JALAPA

Foram pesados 400 g de batata de purga secas e trituradas com tamanho de partícula entre 400 – 840 μm e transferidas para um percolador de aço inox onde foi submetida a um processo de maceração por 24 horas utilizando 2000 mL de solução hidroalcoólica 50%. Cerca de 100 mL do extrato foi concentrado em rota evaporador até *secura* e pesado.

METODOLOGIA

Os camundongos foram pesados e marcados após 16 horas de jejum sólido, mas com fornecimento de água *ad libitum*. Foram formados 2 grupos experimentais com 5 animais cada, que foram tratados com o extrato de Jalapa do Brasil concentrado nas doses de 125 mg/Kg (tratado 1) e 250 mg/Kg (tratado 2), ambos diluídos em solução fisiológica. Foram constituídos

ainda um grupo controle com 5 animais, que foi tratado com Atropina 0,1 mg/mL de solução fisiológica e um grupo padrão com 5 animais, que foi tratado com Bisacodil 5 mg.

Decorridos 60 min. dos tratamentos, administrou-se por via oral o carvão ativado 0,1 mg/mL, a todos os animais, através da cânula de gavagem.

Após 30 min os animais foram sacrificados, sob anestesia etérea profunda.

O estômago e o intestino foram removidos e medidos os comprimentos totais dos intestinos e a distância percorrida pelo carvão do piloro à última porção do intestino.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem do percurso do marcador em função do comprimento intestinal total (100%) e representados a partir das médias \pm erro padrão das médias do trânsito em histograma.

A porcentagem de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino para os grupos controle, padrão, tratado 1 e tratado 2 foram respectivamente, 40,85%; 79,53%; 26,19% e 72,41%.

Os resultados obtidos no ensaio demonstraram um aumento significativo da motilidade intestinal dos camundongos na dose de 250 mg/kg quando comparado ao grupo controle, uma vez que a atropina atua como antagonista competitivo, diminuindo a motilidade intestinal.

Em conclusão, o efeito laxante da *Operculina macrocarpa* pode ser associado ao seu efeito propulsor da motilidade intestinal. Entretanto, outros estudos farmacológicos são necessários para elucidar o seu exato mecanismo de ação.

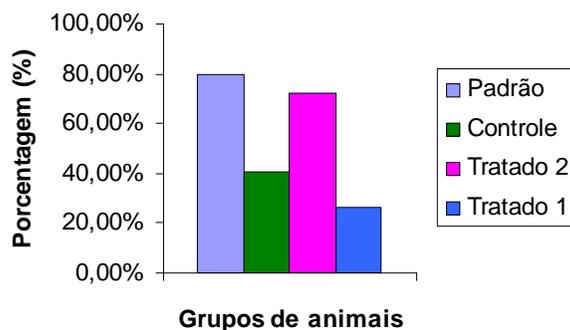


Figura 11. Fluxograma de trânsito intestinal.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, p.29-33, 2003.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, 2000.

MATOS, F.J.A. **Aproveitamento de plantas medicinais da região nordeste**. Revista Brasileira de Farmácia, v.63, n.3/4, p.132-140, 1982.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. 2 ed, Fortaleza: EUFC, 1994.

MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. **Avaliação da atividade laxante de Operculina macrocarpa L. Urban (Convolvulaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.14, n.2, p.105-109, 2004.

PEREDA, M.R.; BAH, M. **Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries**. Current Topics in Medicinal Chemistry, v.3, n.2, p.111-113, 2003.

STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, UNESP, 1995.

TESKE, M.; TRENTTINI, A.M.M. **Compêndio de Fitoterapia**. Paraná: Herbarium, 3^o edição, p.190-191, 1997.

CAPÍTULO V

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS DE JALAPA DO BRASIL - *OPERCULINA MACROCARPA* (L.) URBAN

5.1.INTRODUÇÃO

A via oral para administração de fármacos constitui o método mais divulgado de administração dos mesmos para efeitos sistêmicos. Dos medicamentos que são administrados oralmente, as formas sólidas são as preferidas, por constituírem formas farmacêuticas unitárias permitindo a administração de uma única dose exata do fármaco (LACHMAN,2001).

A granulação úmida(figura 12) é um método amplamente empregado para a produção de comprimidos feitos por compressão. As etapas da preparação por esse método podem ser divididas da seguinte maneira: 1) pesagem e mistura de componentes, 2) preparo da granulação úmida, 3) formação de grânulos pela passagem da massa úmida em malha, 4) secagem, 5) calibração do grânulo seco, 6) mistura do lubrificante, 7) compressão (ANSEL,2000).

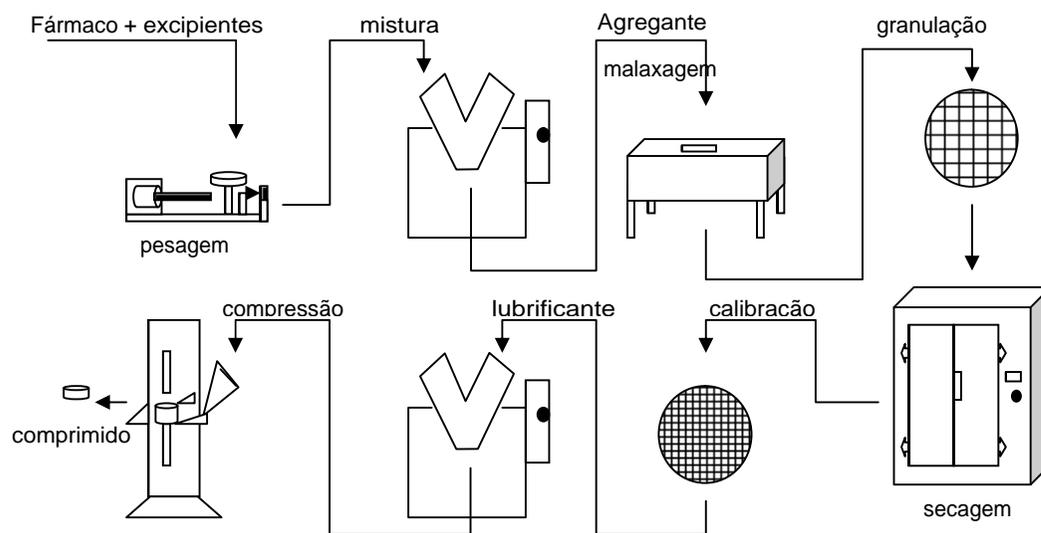


Figura 12. Representação do processo de granulação por via úmida.

Algumas substâncias possuem propriedades que possibilitam que sejam compactadas diretamente, sem necessidade de granulação úmida ou seca. Atualmente, o uso de certos excipientes, com propriedades de fluidez e compressibilidade, proporcionam a algumas formulações, as condições necessárias para compressão direta, figura 13 (ANSEL,2000).

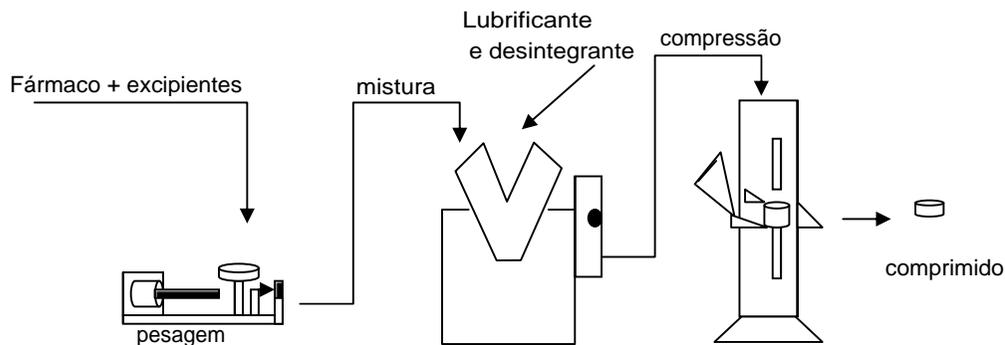


Figura 13. Representação do processo de compressão direta.

As formas farmacêuticas sólidas orais são amplamente utilizadas, dentro dessa categoria de medicamentos, a maior parte é administrada sob a forma de comprimidos. A produção de comprimidos pelo método de compressão direta se atribui alguns inconvenientes, com a tendência ao aumento da dureza e aderência do pó, aumento no tempo de desintegração e problemas associados ao fluxo irregular. No caso particular de comprimidos contendo extratos vegetais, esta situação se agrava devido à higroscopicidade inerente a estes extratos, assim como, a presença de produtos com açúcares que dificultam a mistura e resultam na formação de grânulos de difícil secagem e difíceis de comprimir (CRIPPA, 1978). Algumas medidas recomendadas para estes problemas seriam tanto o uso de celulose no processo de compressão direta, como de extratos atomizados (ORTEGA & SCHMIDT, 1995).

Outra tecnologia em evidência é o spray drying (figura 14) muito utilizada em diversos segmentos industriais incluindo o farmacêutico. A técnica de secagem por aspersão ou spray drying baseia-se na secagem de líquidos e suspensões por divisão destes em finas gotículas, dentro de uma torre de secagem munida de ar quente circulante. Embora seja uma técnica cara que necessite de altos investimentos em instalações e operação, muitas são as razões pelas quais a mesma é muito utilizada apesar do alto custo. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais tanto sensíveis quanto resistentes ao aquecimento, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas e a flexibilidade para a definição de um projeto com base na formulação (WENDEL & CELIK, 1998).



www.brinkmann.com

Figura 14. Spray drying

Extratos vegetais secos por nebulização têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (SOARES, 2003).

A otimização dos parâmetros de secagem, como temperaturas de entrada e saída e velocidade de fluxo de alimentação, assim como teor de resíduo seco do extrato fluido a nebulizar são fatores indispensáveis na obtenção de uma operação com maiores rendimentos e extratos secos com melhores características físico-químicas (ORTEGA & SCHMIDT, 1995).

5.2.MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAIS

MATÉRIAS-PRIMAS

O material utilizado foi o extrato hidroalcológico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*) na forma fluida, o extrato hidroalcológico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*) na forma nebulizada por spray drying, Celulose microcristalina 250, Lote:1564/02, Estearato de Magnésio, Lote: 13558, Glicolato de amido sódico, Lote: 14415, Croscarmelose Sódica, Lote:14088, Celulose Microcristalina 101, Lote:13451.

EQUIPAMENTOS

Processo de Fabricação

Compressora Excêntrica Neuberger modelo 3135 N, punção de 10mm circular plano, Estufa Imarvil modelo HP1, Granulador Rotativo Fabbe Primar modelo 179, malha de 1,5 e 3mm, Misturador tipo “V” Lawes modelo 510/65 SM, Malaxadeira Cestari modelo K70, Balança semi-analítica marte modelo A500

Controle de Qualidade

Friabilômetro Nova Ética modelo 300, Desintegrador Ética modelo 207, Durômetro Nova Ética modelo 298 DGP, Balança analítica Sartorius modelo CP225D.

MÉTODOS

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO

Preparação do extrato de Jalapa

Foram coletadas amostras de *Operculina Macrocarpa* em São José de Espinhais no Estado da Paraíba, numa vegetação de caatinga, situada nas coordenadas: 06°50'50''S e 37°19'33''W.

Foram pesados 400 g de tubérculo de jalapa, secas e trituradas com tamanho de partícula entre 400 - 840µm e transferidas para um percolador de aço inox onde foi submetida a um processo de maceração por 24 horas utilizando 2000 mL de solução hidroalcoólica 50%.

Estudo de pré-formulação

Após a obtenção do extrato hidroalcoólico contendo a resina da jalapa, foram testados processos visando veicular o ativo numa forma farmacêutica sólida. Assim sendo foi proposto um estudo de pré-formulação.

A partir de uma planificação qualitativa, os comprimidos foram obtidos por diferentes processos de fabricação:

Os lotes bancada (LB) I e II foram produzidos por via úmida, umedecendo por sucessivas vezes o extrato de jalapa à celulose microcristalina 101, utilizada no processo como diluente. Em seguida, a mistura foi granulada e tamisada passando pelo processo de secagem em estufa a 50°C após cada etapa de molhagem. O processo foi repetido até a incorporação de uma quantidade mínima de resina, ao granulado, para obtenção do efeito farmacológico. O granulado seco foi novamente tamisado e a este foi adicionado, em um dos lotes: estearato de magnésio e glicolato (LB I), lubrificante e desintegrante respectivamente, e ao outro: estearato de magnésio e croscarmelose sódica (LB II). A mistura de pós e granulados obtidas foram submetidas à compressão em máquina excêntrica utilizando punção circular plano de 10mm.

Como foi obtido um extrato nebulizado por spray drying de jalapa, este foi utilizado para a obtenção do lote bancada III (LB III) misturado a celulose microcristalina 250, ao glicolato e ao estearato de magnésio, em seguida foi realizado a compressão direta, com punção circular plano de 10mm, por fim, com o objetivo obter-se comprimidos(tabela 3).

Tabela 3: Composição dos lotes de bancada (LB) para definição do comprimido de jalapa 250 mg

| Componentes | LB I (%) | LB II (%) | LB III (%) |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Resina de Jalapa | - | - | 23,77 |
| Celulose microcristalina 250 | - | - | 71,23 |
| Celulose microcristalina 101 + resina | 95 | 95 | - |
| Croscarmelose sódica | - | 3 | - |
| Glicolato de amido sódico | 3 | - | 3 |
| Estearato de magnésio | 2 | 2 | 2 |
| Total | 100 | 100 | 100 |

5.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de jalapa foi utilizado como substância molhante e devido ao seu conteúdo resinoso possibilitou a agregação do diluente celulose microcristalina 101, sendo obtidos grânulos resistentes. Esta umectação foi repetida várias vezes consecutivas com o objetivo de incorporar 250 mg de resina na mistura de pó, quantidade mínima para desencadear um efeito farmacológico. Contudo, neste processo foi possível incorporar 80% da resina, o que

corresponde a 200 mg. Foi verificado que após cada umectação, a resistência dos grânulos era incrementada o que poderia causar problemas na etapa seguinte de compressão, este sendo o motivo de cessar com a molhagem. Buscando minimizar as variáveis, decidiu-se que o mesmo granulado após calibração foi dividido em partes iguais para em seguida adicionar o desintegrante e o lubrificante, dando início a etapa de planificação qualitativa para tipos de desintegrante. Sabe-se que outros fatores podem influenciar na desintegração dos comprimidos, como por exemplo, a força de compressão, o que aumentaria a dureza, um outro parâmetro de qualidade a ser analisado. Neste estudo, apesar de ter sido utilizado um superdesintegrante (croscarmelose) no LB II em comparação com o glicolato (desintegrante convencional utilizado na rotina industrial) presente no LB I, os resultados obtidos demonstram claramente a influência da força de compressão nos parâmetros de dureza e tempo de desintegração(tabela 4).

Tabela 4. Resultado do controle de qualidade dos lotes de bancada (LB) para os comprimidos de jalapa 250 mg

| Testes | Especificações | LB I | LB II |
|------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| PESO MÉDIO | 350mg ± 5% | 352,76 mg | 359,22mg |
| FRIABILIDADE | <1,0% | 0,12% | 0,18% |
| DUREZA | > 3,5 Kgf/cm ² | 4,06 | 5,1 |
| TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO | < 30 minutos | 9,4 min | 14,54 min |

Após avaliação preliminar dos comprimidos obtidos por via úmida, outra proposta para o processo de fabricação para obtenção dos comprimidos de jalapa foi avaliada, partindo do extrato nebulizado por spray drying. O pó contendo o ativo foi misturado a celulose microcristalina 250, diluente selecionado para o processo de compressão direta devido apresentar características de compressibilidade e compactabilidade apropriados, em seguida foi adicionado o glicolato como desintegrante e o estearato de magnésio como lubrificante nas mesmas proporções quantitativas utilizadas no processo por via úmida.

Os resultados apresentados não foram conclusivos, visto que para esta etapa do estudo o quantitativo obtido do pó ativo por spray drying (6,0 g) não foi suficiente para realização mais aprofundada da proposta de formulação, além de também não ser possível a realização da avaliação analítica. Porém, alguns resultados preliminares demonstraram que os comprimidos apresentaram-se sem uniformidade na mistura de pós, o que foi observado pela descrição da

coloração da superfície com manchas. Também foi observado que a superfície apresentou-se com aspecto pegajoso, que pode estar relacionado com sua própria composição resinosa. Durante o processo de compressão, os comprimidos também apresentaram-se aderidos ao punção. Este problema poderia ter sido amenizado com a incorporação do dióxido de silício coloidal ao extrato antes do processo de nebulização e até mesmo na composição da formulação.

5.4.CONCLUSÃO

Este estudo foi concebido visando a obtenção da forma farmacêutica comprimido contendo jalapa, sendo estes os primeiros passos para nortear o desenvolvimento do produto. A partir desta avaliação preliminar, outras sugestões serão atribuídas ao processo com o intuito de aprofundar os ensaios e avaliações analíticas para garantir a qualidade e eficácia do novo produto.

5.5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J., **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**, 6 ed. São Paulo: Editorial premier, 2000.

CRIPPA, F., **Problems of Pharmaceutical Technics with Plant Extracts**, Pharmaceutical Technology, p.257-263, 1978.

LACHMAN, L et al. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gubelkian, v2, 2001.

ORTEGA, G.G.; SCHMIDT, P.C., **Obtención de Comprimidos contiendo Extractos Atomizados de Flor de la Pasión**, Acta Farm. Bonaerense, 14 (3), p.173-180, 1995.

SOARES, L.A.L.; SCHMIDT, P.C., ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R., **Efeito da Força e da Velocidade de Compressão sobre as Propriedades de Comprimidos contendo alta Concentração de Extrato Seco Vegetal**, Acta Farm. Bonaerense, 22 (2), p.147-54, 2003.

WENDEL, S.; ÇELIK, M., **Uma Visão Geral Sobre o Uso da Tecnologia de Spray-Drying**, Pharmaceutical Technology, p.32-43, 1998.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Os resultados obtidos pela prospecção fitoquímica foram positivos para triterpenóides, esteróides, açúcares redutores e cumarinas;
- O conteúdo de resina glicosídica em *Operculina macrocarpa* se deve a moléculas de polaridade elevada, solúveis em metanol. Sendo estas constituídas por glico-resinas cujos açúcares são predominantemente glicose, rhamnose e fucose
- A jalapina, supostamente contida no resíduo clorofórmico não foi encontrada.
- Após estudo de padronização do extrato de jalapa, levando-se em consideração uma redução do tempo e custo do processo, foi selecionado o extrato contendo: matéria-prima (pó bruto), solução hidroalcoólica (50: 50; v/v), macerado por 24 horas;
- Os resultados com a validação da metodologia analítica de resina glicosídica contida na *O. macrocarpa* obtidos mostram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório, pois apresenta a confiabilidade requerida para um método analítico;
- O efeito laxante da *Operculina macrocarpa* foi associado ao seu efeito propulsor da motilidade intestinal;
- O estudo de pré formulação foi concebido visando a obtenção da forma farmacêutica comprimidos contendo jalapa, sendo estes os primeiros passos para nortear o desenvolvimento da forma farmacêutica comprimidos.

ANEXO

Pasta Atual: **Entrada****Desconectar**[Escrever](#) [Endereços](#) [Pastas](#) [Opções](#) [Procurar](#) [Ajuda](#) [Calendário](#)[UFPE](#)[Lista de](#)[Mensagens](#) | [Apagar](#)[Anterior](#) | [Próxima](#) [Encaminhar](#) | [Encaminhar como anexo](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#)**Assunto:** Revista Brasileira de Farmacognosia - FG 227**De:** Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha <emidio@ltf.ufpb.br>**Data:** Mon, Fevereiro 20, 2006 3:39 pm**Para:** prolim@ufpe.br**Prioridade:** Normal**Recibo de pedida** [[Enviar recibo de leitura](#)]**leitura:****Opções:** [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#)

Prezado Prof. Pedro Rolim,

É com satisfação que informo que o artigo FG 227, de autoria de Lima e col., intitulado "Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápico contendo Operculina macrocarpa (L.) Urban" foi aceito e será publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia, em um dos fascículos do volume 16 em 2006.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Emídio V. L. da Cunha

Editor Associado da RBF

Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

Anexados:[untitled-\[2\]](#)

7,9 kB

[[text/html](#)]][baixar](#) | [ver](#)