



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA

JÉSSICA CAPORAL ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ALCALOIDES EM DIFERENTES
ORGÃOS DA *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON**

BELÉM
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA

JÉSSICA CAPORAL ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ALCALOIDES EM DIFERENTES
ORGÃOS DA *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Química Industrial, pela Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas.

Coorientadora: Dra. Nádia Elígia Nunes Pinto Paracampo.

BELÉM
2019

JÉSSICA CAPORAL ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ALCALOIDES EM DIFERENTES
ORGÃOS DA *Carapichea ipecacuanha* (BROT.) L. ANDERSSON**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para obtenção de grau de
Bacharel em Química Industrial, pela
Universidade Federal do Pará.

Data de aprovação: ____/____/____

Conceito: _____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas
Orientadora – UFPA

Dra. Nádia Elígia Nunes Pinto Paracampo
Coorientadora – Embrapa Amazônia Oriental

Dr. Osmar Alves Lameira
Examinador externo – Embrapa Amazônia Oriental

Profa. Dra. Michelle de Souza Lemos
Examinador interno – UFPA

A Deus em primeiro lugar, pela vida, bênçãos e saúde. Aos meus pais, familiares, amigos e professores pelos ensinamentos. A Universidade Federal do Pará e a Embrapa por ter embasado minha formação profissional, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, que me conduziu com as devidas lições de amor, fraternidade e compaixão hoje e sempre.

Ao meu pai, Alisson, minha mãe, Micheli, meus irmãos, Sandro, Poliana e Alana Layse, e meus familiares, que estiveram sempre presentes, me dando apoio e carinho para que eu pudesse continuar lutando nesta etapa da minha vida profissional.

Agradeço a minha orientadora, Dr. Kelly Dantas, pelo apoio e orientação prestados.

Agradeço a minha Coorientadora, Dr. Nádia Paracampo, pelos ensinamentos, amizade e por gentilmente ter me ajudado e me guiado no decorrer deste trabalho, me dando todo o suporte necessário,

Agradeço também aos meus amigos da universidade, Fernanda, Amanda, Breno, Maycon, Luíz e Alan, que sempre torceram pelo meu sucesso e me apoiaram no decorrer da universidade. Também a equipe de professores que ministraram aula ao curso de Química Industrial de 2016, por todo o conhecimento e experiências repassados.

Agradeço a Embrapa Amazônia Oriental e a toda equipe do Laboratório de Agroindústria, pela oportunidade de estágio e pelos ensinamentos da prática em laboratório.

Muito obrigada também a meu namorado, Paulo Augusto, que compartilhou comigo esse momento, sendo paciente em minhas ausências e me dando apoio moral para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, sou grata a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, participaram da realização desse trabalho.

RESUMO

A ipeca (*Carapichea ipecacuanha*) (Brot.) L. Andersson é uma planta medicinal de pequeno porte e grande interesse à indústria farmacêutica, isso se deve à atividade biológica apresentada por seus metabólitos majoritários: emetina e cefalina. Considerando que esses alcaloides são encontrados em maiores quantidades nas raízes e sua colheita é basicamente extrativista, a ipeca entrou na lista de espécies ameaçadas de erosão genética e extinção. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo analisar a distribuição dos alcaloides cefalina e emetina em diferentes órgãos de *C. ipecacuanha*, como alternativa para minimizar o extrativismo predatório da raiz dessa espécie. Foram analisadas amostras coletadas que compõem o Banco Ativo de Germoplasma de *C. ipecacuanha* da Embrapa Amazônia Oriental, constituída de raiz, caule, folha e fruto. Essas amostras foram submetidas ao processo de extração dos alcaloides emetina e cefalina, utilizando-se um banho de ultrassom ou agitador vortex e, posteriormente foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Foi possível quantificar os marcadores químicos em todos os órgãos analisados, com exceção do fruto, onde a identificação de cefalina não foi possível. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que a folha seria uma opção como matéria prima ao processo de extração dos alcaloides na planta em questão, com teor de cefalina e emetina consideráveis e sem causar maiores prejuízos a *C. ipecacuanha*, em comparação ao método tradicional de retirada das raízes. Entretanto, maiores estudos ampliando o tamanho da amostra são necessários para a confirmação.

Palavras-chave: Planta medicinal, ipeca, emetina, cefalina, cromatografia líquida.

ABSTRACT

The ipeca (*Carapichea ipecacuanha*) (Brot.) L. Andersson is a small medicinal plant of great interest to the pharmaceutical industry. This is due to the biological activity presented by its major metabolites: emetin and cephalin. Considering that these alkaloids are found in larger quantities in the roots and their harvest is basically extractivist, ipeca has entered the list of species threatened with genetic erosion and extinction. Thus, the present work aimed to analyze the distribution of cephalin and emetine alkaloids in different organs of *C. ipecacuanha*, as an alternative to minimize predatory root extraction of this species. Samples collected from the Embrapa Eastern Amazonian *C. ipecacuanha* Active Germplasm Bank, composed of root, stem, leaf and fruit, were analyzed. These samples were submitted to the extraction process of the emetine and cephalin alkaloids, using an ultrasonic bath or vortex shaker, and were subsequently quantified by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). It was possible to quantify the chemical markers in all analyzed organs, except the fruit, where the identification of cephalin was not possible. Based on the results obtained, it was found that the leaf would be an option as a raw material for the alkaloid extraction process in the plant in question, with considerable cephalin and emetine content and without causing greater damage to *C. ipecacuanha*, compared to the method. traditional root removal. However, further studies expanding the sample size are needed for confirmation.

Keywords: Medicinal plant, ipeca, emetine, cephaeline, liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Distribuição geográfica de <i>Carapichea ipecacuanha</i> | 15 |
| Figura 2 – Ilustração das folhas, raízes, flores e frutos de <i>Carapichea ipecacuanha</i> | 16 |
| Figura 3 – Flor da ipeca. | 16 |
| Figura 4 – Estrutura da emetina e cefalina, respectivamente. | 20 |
| Figura 5 – <i>Carapichea ipecacuanha</i> . a) espécime adulto; b) folha; c) fruto; d) caule; e) raiz. | 24 |
| Figura 6 – Exsicata de <i>Carapichea ipecacuanha</i> IAN N° 194095. | 25 |
| Figura 7 – Amostras de <i>Carapichea ipecacuanha</i> secas e trituradas. a) folha; b) fruto; c) raiz; d) caule. | 25 |
| Figura 8 – Etapas da extração. a) agitação; b) centrifugação; c) separação do extrato etéreo. | 26 |
| Figura 9 – Extratos após evaporação. | 26 |
| Figura 10 – Armazenamento dos extratos em vials para HPLC. | 26 |
| Figura 11 – Gráfico do gradiente da fase móvel. Composição (%) x Tempo (min). | 28 |
| Figura 12 – Cromatograma do padrão de emetina e cefalina. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 30 |
| Figura 13 – Cromatograma do extrato da raiz obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 30 |
| Figura 14 – Cromatograma do extrato do caule obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 31 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 – Cromatograma do extrato da folha obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 31 |
| Figura 16 – Cromatograma do extrato do fruto obtido por agitação em banho de ultrassom. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 32 |
| Figura 17 – Índice pluviométrico na cidade de Belém em 2019. | 33 |
| Figura 18 – Teor de emetina e cefalina em diferentes órgãos de Carapichea ipecacuanha. Extratos obtidos por agitação em vortex, com exceção do fruto, e analisados por HPLC-DAD. | 34 |
| Figura 19 – Cromatograma do extrato da amostra 577 obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm. | 36 |
| Figura 20 – Espectro no UV-Vis do padrão de cefalina. | 36 |
| Figura 21 – Espectro no UV-Vis do padrão de emetina. | 36 |
| Figura 22 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no início do pico. | 37 |
| Figura 23 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no meio do pico. | 37 |
| Figura 24 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no final do pico. | 38 |
| Figura 25 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no início do pico. | 38 |
| Figura 26 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no meio do pico. | 39 |
| Figura 27 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no final do pico. | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 28 – Curva analítica para emetina. | 40 |
| Figura 29 – Curva analítica para cefalina. | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Valores de limite de detecção estimados para emetina e cefalina utilizando-se o software Acion Stat a partir dos dados das curvas de calibração externa..... | 32 |
| Tabela 2 – Equações da reta para os padrões de emetina e cefalina, onde y é a área sob o sinal e x é a concentração do marcador químico, expressa em mg/mL. | 33 |
| Tabela 3 – Valores das concentrações médias, desvios padrões e desvios padrões relativos para avaliação de repetibilidade e precisão intermediária do método para quantificação de emetina..... | 40 |
| Tabela 4 – Valores das concentrações médias, desvios padrões e desvios padrões relativos para avaliação de repetibilidade e precisão intermediária do método para quantificação de cefalina..... | 41 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DAD – *Diode Array Detector* – Detector de arranjo de diodos

HPLC – *High-performance liquid chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência

LD – Limite de detecção

PEAD – Polietileno de alta densidade

pH – Potencial hidrogeniônico

RPM – Rotação por minuto

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1. Objetivo geral | 14 |
| 2.2. Objetivos específicos | 14 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 3.1 Ocorrência geográfica de <i>Carapichea ipecacuanha</i> | 14 |
| 3.2. Aspectos ecológicos | 15 |
| 3.3. Morfologia | 15 |
| 3.4. Cultivo e extrativismo | 17 |
| 3.5. Propriedades farmacológicas | 18 |
| 3.6. Mercado | 18 |
| 3.7. Composição química | 19 |
| 3.8. Alcaloides | 19 |
| 3.9. Cromatografia | 20 |
| 3.10. Cromatografia líquida de alta eficiência | 21 |
| 3.11. Quantificação de emetina e cefalina | 22 |
| 3.12. Validação do método | 22 |
| 4. METODOLOGIA | 23 |
| 4.1. Material e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais | 23 |
| 4.2. Coleta e identificação do botânico | 24 |
| 4.3. Processamento do material botânico e extração de emetina e cefalina | 25 |
| 4.4. Preparo das soluções-padrão de emetina e cefalina | 27 |
| 4.5. Preparo da solução tampão da fase móvel | 27 |
| 4.6. Análise por HPLC-DAD | 27 |
| 4.7. Determinação do teor de água em drogas vegetais (umidade) | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8. Validação do método | 28 |
| 4.9. Tratamento de resíduos | 29 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 29 |
| 5.1. Seleção do método de extração | 29 |
| 5.3. Identificação de emetina e cefalina | 29 |
| 5.4. Quantificação de emetina e cefalina | 33 |
| 5.2. Validação do método | 35 |
| 6. CONCLUSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são de suma importância para os seres humanos, pois apresentam características que ajudam no tratamento de doenças ou que melhoram as condições de saúde das pessoas. Atualmente, várias plantas medicinais se encontram ameaçadas de extinção, devido ao extrativismo predatório das mesmas. Esse impasse ocorre desde o muito tempo atrás, pois o extrativismo irracional e incontrolável vem sido feito por mateiros, pela própria população interiorana, pessoas sem conhecimento técnico, sem expectativa de preservação e cultivo sustentável, colocando em risco de extinção várias espécies nativas (DUARTE, 2016). Um grande exemplo de planta medicinal que sofre de extinção é a espécie *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson, da família *Rubiaceae*, conhecida popularmente como ipeca, poaia ou planta-de-doente-de-estrada. Esta planta é um subarbusto de pequeno porte, rasteira, que pode atingir até 30 cm de altura. A ipeca distribui-se geograficamente nas florestas tropicais da América, em Costa Rica, Nicarágua, Panamá, Colômbia e Brasil (SILVA, 2014).

A Ipeca é uma planta medicinal que possui atividade farmacológica devido à presença de dois alcaloides isoquinilínicos: a emetina ($C_{29}H_{40}N_2O_4$) e a cefalina ($C_{28}H_{38}O_4N_2$), dando à planta um poder emético e amebicida, seu uso principal é como emético, essa propriedade deve-se mais à cefalina que à emetina, provocando vômito em ocasiões de intoxicação, com o objetivo de impossibilitar ou diminuir a absorção do agente tóxico ingerido e que ainda está no estômago (SILVA, 2014). Em concentrações menores, aplica-se como expectorante nas bronquites e asma, com o intuito de facilitar a eliminação das mucosidades dos brônquios, purgativo e tônico. Já a emetina, desempenha uma ação tóxica para vários micro-organismos (SOUSA et al. 1991).

Para a obtenção da emetina e cefalina, demandadas pela indústria farmacêutica, faz-se a retirada da raiz da planta, pois é a parte que possui maior concentração desses alcaloides. Entretanto, arrancando-se a raiz, a espécie não se regenera e por essa razão a ipeca é uma espécie ameaçada de erosão genética ou em vias de extinção, pelo fato de ter sofrido intenso processo extrativo por mais de dois séculos (ROCHA & LAMEIRA, 2011). Atualmente, essa exploração predatória está acabando com os estoques naturais, mesmo sendo proibida por lei.

Diante do exposto e a importância econômica da ipeca, torna-se evidente a necessidade de alternativas para continuar obtendo-se os alcaloides sem que haja

maiores prejuízos à espécie *Carapichea ipecacuanha*. Uma alternativa para tal impasse é fazer o processo de extração dos alcaloides em outro órgão, evitando o extrativismo da raiz da ipeca.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar o teor e a distribuição de alcaloides em *Carapichea ipecacuanha*.

2.2. Objetivos específicos

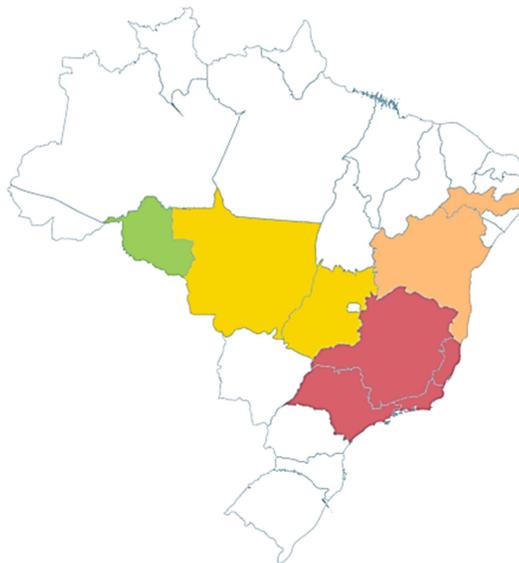
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação simultânea de cefalina e emetina em *Carapichea ipecacuanha*.
- Comparar os teores de emetina e cefalina em raiz, caule, folha e fruto da *Carapichea ipecacuanha*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Ocorrência geográfica de *Carapichea ipecacuanha*

A *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (TAYLOR; GEREAU, 2013), de origem nativa i-pe-kaa-guéne, que tem como significado planta de doente de estrada, é considerada uma planta medicinal e conhecida por ipeca, poaia, ipecacuanha, dentre outras. Essa espécie é encontrada em regiões úmidas das florestas tropicais da América, como no Brasil, Colômbia, Venezuela, Guianas, América Central e outros. O Brasil é considerado como seu centro de origem, sendo encontrada no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Rondônia, Goiás, Pernambuco, Espírito Santo, Bahia e São Paulo. Entretanto, a área de maior ocorrência é no Município de Cáceres, no Estado de Mato Grosso. (LAMEIRA, 2002). Na Figura 1, pode-se observar a distribuição geográfica da ipeca no país.

Figura 1 – Distribuição geográfica de *Carapichea ipecacuanha*.



Fonte: Flora do Brasil 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13851>. Acesso em: 22 de novembro de 2019.

3.2. Aspectos ecológicos

A *Carapichea ipecacuanha* ocorre na América do Sul e América Central, em locais com altitudes desde o nível do mar até 1500 a 1600 metros. Essa espécie possui melhor desenvolvimento em regiões sombreadas e úmidas, contendo solos ricos em húmus e parcialmente ácidos (DUARTE, 2016). A associação vegetativa com árvores imensas e elevada umidade relativa do ar são requisições da ipeca de acordo com Pinto (1976).

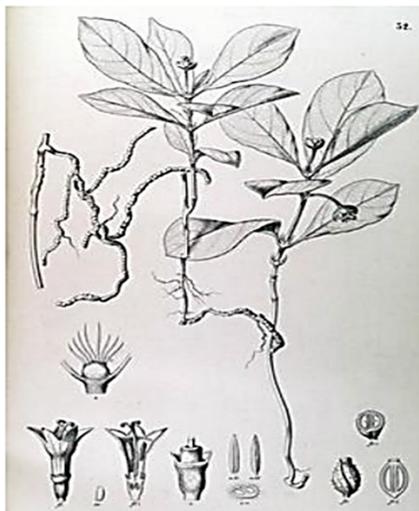
A ipeca ocorre em formações reboleiras (SILVA et al., 2015) formadas por indivíduos oriundos de crescimento vegetativo da planta ou por pássaros que disseminaram sementes na mata, chamados de poaieiros. São baixas as possibilidades de defrontarem-se enfermidades e pragas na ipeca. Entretanto, quando encontradas, as pragas mais comuns são grilo, nematoides, formigas saúva e quenquém, e como doenças, ataque de fumagina, necrose do tecido foliar e apodrecimento das raízes (PINTO, 1976).

3.3. Morfologia

A ipeca é um subarbusto que possui de 20 a 30 cm de altura, constituída por folhas simples e opostas, lanceoladas ou ovais. Apresenta flores brancas (Figura 3), contém fruto carnoso com duas sementes de cor escura e seu caule é fino, ereto ou

prostrado. As raízes da ipecacuanha variam de 10 a 25 cm de comprimento e, são delgadas, cilíndricas, de cor acinzentada, com anéis destacados e próximos uns aos outros (GARCIA, 2001). Essas raízes crescem de forma torcida e ramificam-se com o passar do tempo, a parte inferior é carnosa e fibrosa, apresenta cheiro fraco quando frescas e um sabor amargo que causa náuseas (LAMEIRA, 2002). Na Figura 2, é possível verificar a estrutura morfológica de *Carapichea ipecacuanha*.

Figura 2 – Ilustração das folhas, raízes, flores e frutos de *Carapichea ipecacuanha*.



Fonte: Flora Brasiliensis Online, 2005.

Figura 3 – Flor da ipeca.



Fonte: Lameira, 2002.

A espécie *Carapichea ipecacuanha* é uma planta que se dissemina, sobretudo de forma vegetativa, ou seja, o crescimento e desenvolvimento são por meios assexuados, sob específica condição ecofisiológica de umidade e temperatura elevada e isenta de intensa radiação solar (LAMEIRA, 2002).

3.4. Cultivo e extrativismo

O começo da exploração da ipeca no Brasil foi há muitos anos atrás, na época da colonização, os colonizadores utilizaram a mão-de-obra indígena para a exploração, devido ao conhecimento que os índios possuíam sobre os locais de ocorrência dessa planta e de seus usos terapêuticos (TEXEIRA et al., 2012). Consequentemente, a espécie integrou a pauta de produtos tropicais exportados pelo Brasil desde o período colonial (GARCIA, 2001).

No Brasil, o Mato Grosso, é considerado o estado pioneiro da indústria extrativa de ipeca, por ter atingido a produção de aproximadamente 440 toneladas, no século XIX, a partir de 1835. Por volta de 1960 a 1970, a produção alcançou 80 toneladas/ano, decresceu nos anos 80 e em 1993 ficou em torno de 7,5 toneladas/ano (SKORUPA e ASSIS, 1998). O decréscimo que ocorre desde os anos 80 deve-se à forma de exploração dessa espécie, já que no Brasil, limita-se à coleta de espécies silvestres, e não há o replantio de forma correta na mata. Além disso, a destruição das florestas, com sua exploração extrativista, tornou hoje a ipeca quase extinta (LAMEIRA, 2002).

A *Carapichea ipecacuanha* requer condições ambientais características para o seu desenvolvimento e produtividade (NETO, 2007). Para obter êxito em sua cultura, é preciso que seja realizada em seu local de ocorrência ou em outra região que possua aspectos ecológicos idênticos (CHATTERJEE, 1993).

A reprodutividade da *Carapichea ipecacuanha* pode ser feita a partir de sementes, como também, a partir de folhas e fragmentos do caule (COELHO et al., 2013). Foi feito um plantio de folhas e fragmentos de caules de indivíduos de ipeca produzidos na Índia, proporcionando um aumento da espécie naquela região, e atualmente, esse plantio é responsável por em torno de 7 a 10% da produção mundial de ipeca (ASSIS, 1992). No entanto, alguns problemas no cultivo foram gerados devido à perda de viabilidade das sementes após estocagem, produção máxima de raízes após quatro anos e conteúdo máximo de alcaloides durante o terceiro e o quarto ano (CHATTERJEE, 1993).

Além do plantio da ipeca, outras alternativas têm sido desenvolvidas na tentativa de obter-se uma concentração elevada de alcaloides emetínicos, como o cultivo *in vitro* (PAIVA, 2011). Todavia, até o presente momento, não se obteve uma eficiência na aplicabilidade desse método, pois a produção dos alcaloides por técnicas de micropropagação tem resultado em teores de emetina menores do que os obtidos em

plantas coletadas em áreas florestais ou produzidas por cultivo agrônomico, ou seja, pelo método convencional (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, vale ressaltar que sua realização requer muitos reagentes e recursos, não sendo uma alternativa economicamente viável, em termos comerciais.

3.5. Propriedades farmacológicas

As propriedades farmacológicas relacionadas à ipeca, estão ligadas à presença de dois alcaloides: a emetina e a cefalina. Dentre as mencionadas em diversas farmacopeias, as principais propriedades são a sua ação emética, em ocorrências de envenenamento e intoxicações, expectorante (DUARTE, 2016) e amebicida, por sua ação tóxica sobre a *Entamoeba histolytica* (BRUNETON, 1995).

A emetina possui principalmente ação expectorante e amebicida, entretanto, vale ressaltar que em altas doses, pode causar êmese (FCFRP/USP, 2012). Contudo, a cefalina é a mais responsável pela atividade emética da poaia, porém, pelo fato da emetina ser menos emética que a cefalina, além de ser utilizada no tratamento de disenteria amebiana e possuir também ação inibidora da síntese de proteínas e de DNA, ela é usualmente requerida na medicina (SILVA, 2014).

3.6. Mercado

A *Carapichea ipecacuanha* é comercializada para laboratórios através da venda de suas raízes secas ou extrato fluído a partir das raízes. No Brasil esse comércio se destaca no estado de São Paulo e também em outros países como os Estados Unidos, Inglaterra e Canadá e, é estimado com U\$\$ 5 milhões em um mercado potencial. Dentre os países que exportam a ipeca, o Brasil fica em primeiro lugar, seguido do Panamá e Costa Rica. Entretanto, essa exportação vem declinando devido a progressiva devastação das florestas nas zonas produtoras dos Estados de Mato Grosso e Rondônia (LAMEIRA, 2002).

A raiz da ipeca possui um valor médio no mercado nacional de até R\$ 35,00/kg e até U\$\$ 150 o litro do extrato fluído. Apesar dessa espécie possuir um elevado potencial econômico, há poucas ocorrências de cultivo dela no Brasil. O maior número de trabalhos elaborados sobre a espécie em questão, estão relacionados com estudos químicos e farmacológicos (LAMEIRA, 2002).

Em relação a indústria brasileira, a ipeca é utilizada para fabricação de tintura e expectorante em combinação com prometazina e guaiacol (Fenergan® Expectorante) (VIDOTTI e HOEFLER, 2005).

3.7. Composição química

A ipeca desde os primórdios da civilização até os dias atuais é muito utilizada devido as suas propriedades terapêuticas vindas de sua composição alcaloídica, sendo os dominantes a emetina, cefalina, psicotrina e emetamina (YOSHIMATSU, 1991). Além desses, podem ser encontrados outros alcaloides como o-metilpsicotrina, protoemetina, ipecosídeo, 6-o-metilipecosídeo, neoipecosídeo, dimetilalangisídeo, 7-ometilipecosídeo e 3,4-dehidroneoipecosídeo, neocefalina, 7-o-dimetilcefalina, e outras substâncias como amido, açúcares redutores, resinas, tanino, ácido málico, ácido cítrico e ácido ipecacuânico (GARCIA, 2001; LAMEIRA, 2002).

3.8. Alcaloides

Alcaloide foi definido por Pelletier (1983) como “uma substância cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre organismos vivos” (SIMÕES, 2002). São um grupo extenso e variado de metabólitos secundários. Desde a origem da civilização, os alcaloides são abundantemente utilizados na fabricação de venenos e medicamentos, por exemplo. Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, porém estão concentrados em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Sendo assim, a probabilidade de encontrar alcaloides em células jovens, são remotas, já que são armazenadas nos vacúolos. A principal função dos alcaloides nas plantas é de defesa contra invasão de microrganismos, além de proteção contra raios UV (HENRIQUES, 1999).

É possível realizar a extração e o isolamento destes metabólitos devido as suas propriedades de base fraca que promovem sua conversão em sal, quando estão em contato com soluções de ácidos e, em soluções alcalinas, o nitrogênio libera um íon hidrogênio originando uma amina livre. Através da extração, os alcaloides podem ser quantificados por técnicas gravimétricas, volumétricas, método espectrofotométrico, cromatográfico e outras técnicas hifenadas (DUARTE, 2016).

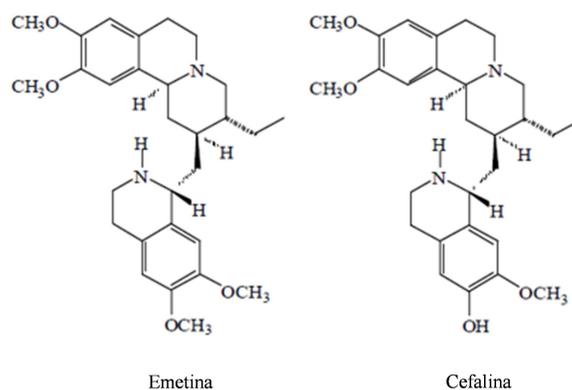
Por conta de sua variedade estrutural, os alcaloides apresentam um amplo espectro em suas atividades biológicas, como por exemplo, algumas espécies são repelentes de herbívoros, enquanto outras são utilizadas na síntese de feromônios. Os variados tipos de atividades biológicas dos alcaloides proporcionam propriedades amebicidas, eméticas, anti-hipertensivos, antimaláricos, antitussígenos, antitumorais, antivirais, estimulantes do sistema nervoso central, entre outros (DUARTE, 2016).

A *Carapichea ipecacuanha* é abundante em alcaloides, sendo os principais: emetina e cefalina, aos quais são atribuídas as propriedades terapêuticas dessa planta. Os alcaloides presentes na ipeca podem ser encontrados em toda a planta, porém as maiores concentrações estão em suas raízes, em níveis entre 2,0 e 2,7%. Todavia, há variação na porcentagem dos alcaloides (ASSIS, 1992) em função da temperatura e da idade das raízes (ASSIS e GIULIETTI, 1999). Segundo Jha et alli (1988), os alcaloides encontram-se em maior taxa quando a planta está na fase adulta, por volta de seus 3 a 4 anos, na época de sua floração.

A emetina é sintetizada a partir da descarboxilação do aminoácido tirosina (COSTA, 2000) e também pode ser feita sinteticamente por meio da metilação da cefalina, entretanto, o produto obtido sinteticamente não apresenta os mesmos efeitos terapêuticos que possuem os extratos da planta (TORRES, 1972).

As fórmulas estruturais da emetina e cefalina estão representadas na figura 4.

Figura 4 – Estrutura da emetina e cefalina, respectivamente.



Fonte: Garcia, 2001.

3.9. Cromatografia

O termo cromatografia, junção de *chrom* que significa cor e *graphie* que significa grafia, foi criado pelo botânico russo Mikhail Tswett no ano de 1903, quando

estava separando os componentes presentes em um extrato de folhas em fases coloridas, utilizando o éter de petróleo para passar através de uma coluna de vidro que era recheada com carbonato de cálcio. (DEGANI e CASS, 2001) Com isso, criou-se a cromatografia em coluna que é a técnica cromatográfica mais antiga, consiste na separação de componentes entre duas fases, sólida e líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade.

De modo geral, a cromatografia é um método físico-químico de separação e identificação de componentes de uma mistura, baseada na migração dos compostos da mistura, os quais apresentam diferentes interações através de duas fases, a fase móvel, onde os componentes a serem isolados eluem por um solvente fluido líquido ou gasoso e a fase estacionária, uma fase que não se locomove, no qual o componente requerido irá ficar retido na superfície de outro material líquido ou sólido.

3.10. Cromatografia líquida de alta eficiência

Na década de 60 com os pesquisadores Horvath, Kirkland e Huber, houve o desenvolvimento da cromatografia líquida, no qual fizeram o uso de colunas com partículas pequenas sendo necessário o uso de bombas de alta pressão, em vista disso, surgiu equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) no início da década de 80, tornando-se indispensável no controle de qualidade industrial por conta de sua versatilidade e precisão. A técnica de HPLC tem o mesmo princípio geral da cromatografia, e destaca-se por fazer a separação de incontáveis substâncias de peso molecular que possuem volatilidade muito baixa, sendo assim, o método por cromatografia gasosa não se aplica. (DUARTE, 2016)

Na cromatografia líquida de alta eficiência, o analito é dissolvido em um solvente e injetado na coluna cromatográfica. Logo após a injeção, um solvente é bombeado com vazão constante, com isso os constituintes da mistura analítica se locomovem pela coluna. A velocidade do deslocamento dos compostos na coluna é inversamente proporcional a afinidade dos mesmos pela fase estacionária, sendo assim, quanto maior a afinidade, mais lento é o deslocamento e quanto menor a afinidade, mais rápido é o deslocamento. O analito passa por um detector, ao sair da coluna, emitindo um cromatograma. (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007)

As colunas cromatográficas podem ser classificadas em normal ou reversa, é de fase normal quando a coluna é constituída por grupos mais polares ligados e a fase móvel menos polar, enquanto que a fase reversa da fase estacionária é constituída de grupos menos polares ligados e a fase móvel utilizada é mais polar (SNYDER e DOLAN, 2007). Com o surgimento da fase reversa, elevou-se as aplicações da cromatografia, passando a ser utilizada em diversas áreas, como: toxicologia, cosméticos, fármacos, pesticidas, proteínas e corantes. Além disso, a fase reversa possibilitou a não influência da água na reprodutibilidade, equilíbrio mais rápido da coluna e entre outras vantagens (SILVA e COLLINS, 2011).

3.11. Quantificação de emetina e cefalina

Em 1981, Hatfield e colaboradores descreveram uma metodologia para determinar os alcaloides da ipeca utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em amostras do Panamá, no qual foram misturadas com hidróxido de amônio (23%) e extraídas com éter etílico, em seguida uma alíquota foi evaporada até secura e no resíduo foi acrescentado diclorometano-metanol (25:1). A fase móvel foi composta por diclorometano-metanol-hidróxido de amônio (250:10:1). A vazão do solvente foi de 1 a 4 mL/minuto, usou-se um detector ultravioleta a 280 nm com um tempo de 10 minutos. A emetina teve uma variação de 0,42% a 1,60% enquanto que a cefalina variou de 0,76% a 1,82% (HATFIELD, 1981).

Em 1984, foi quantificada a emetina e cefalina de amostras de ipecacuanha da América do Sul e do Japão, encontrando uma concentração que variava de 0,6 a 1,43% de emetina e 0,72 a 3,33% de cefalina (TESHIMA, 1984).

3.12. Validação do método

A validação do método tem como designação demonstrar que o método analítico fornece resultados aceitáveis, confiáveis e que estão de acordo com a finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Alguns parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ANVISA 2017).

A seletividade é comprovada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar

presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz e a linearidade deve ser demonstrada através da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA 2017).

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado e deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade e a exatidão é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA 2017).

O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A robustez é um parâmetro realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas variações das condições analíticas (ANVISA 2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Material e equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais

- Estufa com circulação de ar (FANEM, modelo 315 SE);
- Balança analítica (SHIMADZU, modelo AY220);
- Banho de ultrassom (UltraCleaner, modelo USC-1400A);
- Agitador Vortex (Fisatom, modelo 771);
- Centrífuga (FANEM, modelo: EXCELSA BABY II 206-R);
- Banho-maria (QUIMIS, modelo Q218-1);
- Triturador (IKA, modelo A11BS32);
- pHmetro (TECNAL, modelo TEC-3 MP);
- Sistema de filtração a vácuo (ADVANTEC);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Direct);
- Cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) Finnigan SURVEYOR (Thermo Scientific);
- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, lote: 9012-03);

- Hidróxido de amônio PA (NEON, lote: 45079);
- Éter etílico PA (Dinâmica, lote: 103586);
- Acetato de sódio (SIGMA-ALDRICH, lote: BCBZ7333);
- Ácido acético glacial PA (Dinâmica, lote: 90219);
- Unidade filtrante descartável para seringa MILLEX-GV de 0,22 µm;
- Padrão de Emetina (European Pharmacopoeia Reference Standard);
- Padrão de Cefalina (European Pharmacopoeia Reference Standard).

4.2. Coleta e identificação do botânico

O material botânico utilizado no experimento (Figura 5) foi coletado em julho de 2019 no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Foram coletadas amostras de raiz, caule, folha e fruto de um mesmo espécime adulto cultivada no Horto, proveniente de cultivo *in vitro* e codificada como LAB; e raiz de amostra codificada como 577 (procedência: Barra do Bugre, MT). Ambas compõem Banco Ativo de Germoplasma. Exsicata dessa espécie encontra-se depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental sob registro N° 194095 (Figura 6).

Figura 5 – Carapichea ipecacuanha. a) espécime adulto; b) folha; c) fruto; d) caule; e) raiz.

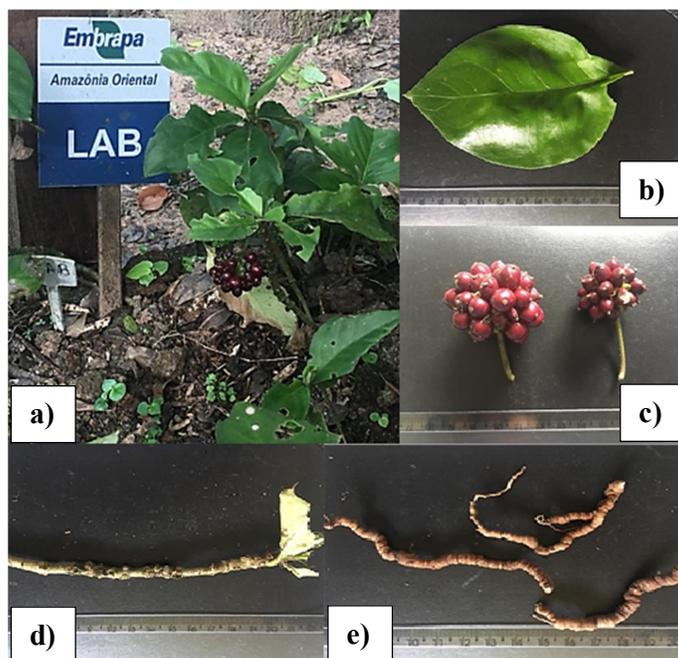


Foto: Nádia Paracampo.

Figura 6 – Exsicata de *Carapichea ipecacuanha* IAN Nº 194095.



Fonte: Imagem cedida pelo Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental.

4.3. Processamento do material botânico e extração de emetina e cefalina

A extração dos alcaloides foi realizada a partir de adaptações das metodologias utilizadas por Garcia et al. (2005), Silva (2014) e Nesmarák et al. (2018). As amostras inicialmente foram lavadas com água corrente e secas em estufa à 50 °C por 48 horas. Em seguida foram moídas com auxílio de um triturador, até atingirem a estrutura de pó fino e armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade (PEAD) (Figura 7), sob refrigeração.

Figura 7 – Amostras de *Carapichea ipecacuanha* secas e trituradas. a) folha; b) fruto; c) raiz; d) caule.

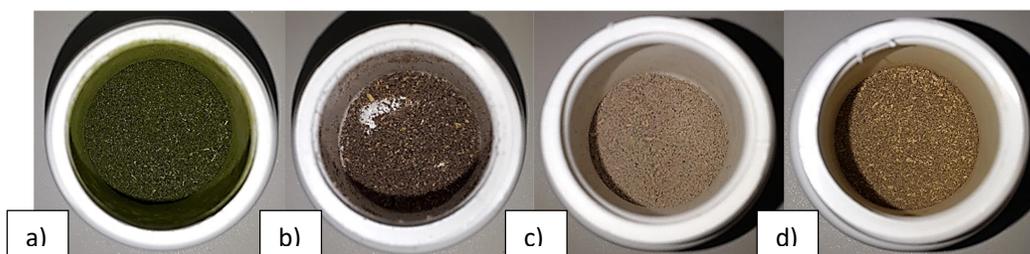


Foto: Jéssica Almeida.

Aproximadamente, 100 mg de amostra foram pesadas e transferidas para tubos de centrifugação tipo Falcon, em triplicata. Em seguida, foi acrescentado 2 mL de hidróxido de amônio 0,1 M e agitou-se em agitador vortex por 1 minuto. Acrescentou-se 10 mL de éter etílico. Amostras foram submetidas à agitação em banho de ultrassom por 10 minutos (Figura 8a) ou agitador vortex por 5 minutos, para comparação de

eficiência de ambos os meios de agitação. Em seguida, os tubos foram colocados para centrifugação por 5 minutos (Figura 8b) com velocidade fixa de 3261 RPM à temperatura ambiente. Logo depois, transferiu-se a fase etérea contendo os alcaloides para um tubo de ensaio e deixou-se evaporar até a secura (Figura 8c e 9) em banho maria com temperatura entre 45°C e 55°C. Os extratos de alcaloides foram redissolvidos com 10 mL de acetonitrila grau HPLC, filtrados em membrana de 0,22 µm e armazenados em vials de vidro (Figura 10) para análise por HPLC-DAD.

Figura 8 – Etapas da extração. a) agitação; b) centrifugação; c) separação do extrato etéreo.

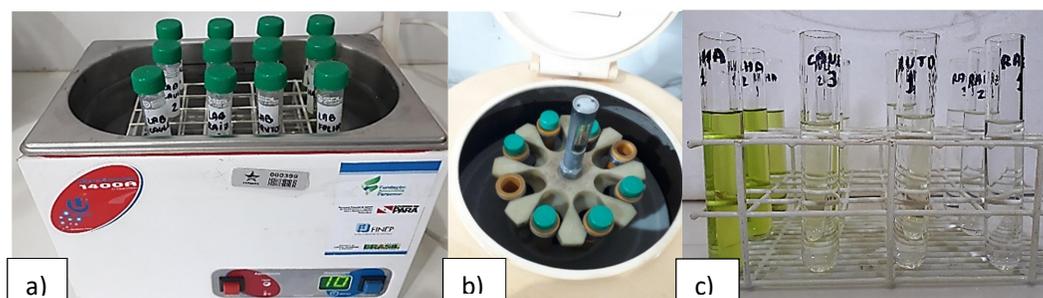


Foto: Jéssica Almeida.

Figura 9 – Extratos após evaporação.

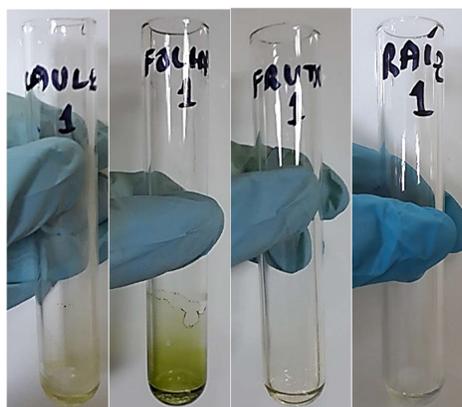


Foto: Jéssica Almeida.

Figura 10 – Armazenamento dos extratos em vials para HPLC.



Foto: Jéssica Almeida.

4.4. Preparo das soluções-padrão de emetina e cefalina

5,4 mg de padrão autêntico de emetina e 5,8 mg de cefalina foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL, solubilizados e aferidos com de acetonitrila grau HPLC.

A partir desta solução contendo os dois analitos de interesse, cinco soluções com concentrações de emetina entre 0,04 e 0,27 mg/mL e cefalina entre 0,04 e 0,29 mg/mL, em duplicata, foram analisadas em HPLC-DAD e os dados dos cromatogramas foram utilizados para a construção da curva de calibração externa para cada analito.

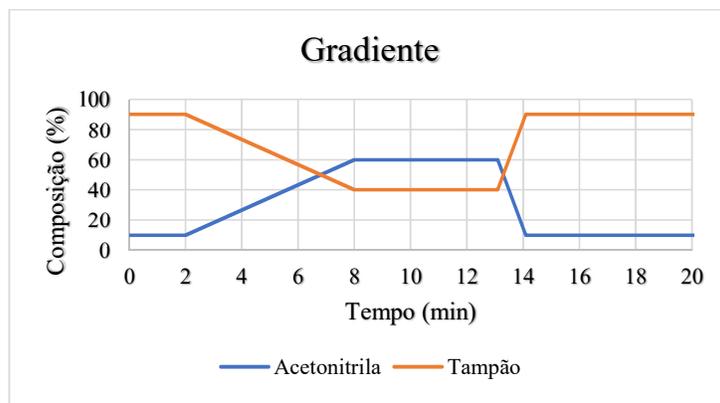
4.5. Preparo da solução tampão da fase móvel

Para o preparo solução tampão de acetato de sódio 0,25 M (pH=5) da fase móvel, foram transferidos 20,715 g de acetato de sódio para béquer de 1 L e solubilizou-se com água ultrapura. Em seguida, ajustou-se o pH em 5 com ácido acético glacial, utilizando pHmetro e agitador magnético, transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e aferiu-se a solução. Filtrou-se o tampão em membrana de 0,45 µm, utilizando sistema de filtração a vácuo.

4.6. Análise por HPLC-DAD

As quantificações de emetina e cefalina nos extratos foram realizadas, simultaneamente, em um sistema de cromatografia líquida utilizando coluna LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E e pré-coluna LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E Merck. A fase móvel foi composta de acetonitrila e tampão de acetato de sódio (pH = 5) com eluição em gradiente (Figura 11). O volume de injeção foi de 10 µL e a vazão de 0,8 mL/min, com temperatura mantida em 21°C ± 2. Tempo de análise de 20 min. Usou-se detector de arranjo de diodos (do inglês, *Diode Array Detector - DAD*) com comprimento de onda na faixa de 200 a 600 nm e aquisição cromatográfica em 280 nm. O software utilizado foi o Xcalibur 2.0. Emetina e cefalina foram detectados por comparação de seus tempos de retenção com os dos padrões autênticos, analisados sob as mesmas condições. A concentração de cada alcaloide foi estimada com base na curva analítica.

Figura 11 – Gráfico do gradiente da fase móvel. Composição (%) x Tempo (min).



Fonte: Elaboração do autor.

4.7. Determinação do teor de água em drogas vegetais (umidade)

A análise de umidade, segundo Farmacopeia Brasileira (6ª edição), foi realizada para efeito de cálculo dos teores de alcaloides em base seca.

Transferiu-se, aproximadamente, 1 g de amostra seca e triturada, em duplicata, para cadinho. Posteriormente, foram colocadas em estufa com circulação de ar à 105°C durante 5 horas e verificou-se até massa constante. Foram feitos os cálculos para obtenção do teor de umidade ($h\%$):

$$h\% = \frac{(Pu - Ps)}{Pm} \times 100 \quad (1)$$

Onde Pm é o peso da amostra, Pu é o peso do recipiente que contém a amostra antes da secagem e Ps é o peso do recipiente que contém a amostra depois da secagem.

4.8. Validação do método

O método de quantificação dos alcaloides (emetina e cefalina) foi validado de acordo com a resolução 166 da ANVISA, publicada em julho de 2017. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção. A seletividade se baseou na comparação dos cromatogramas e dos espectros no ultravioleta (UV) do padrão e da amostra, analisando as bandas de absorção e o tempo de retenção. A linearidade foi determinada pela curva analítica, usando o coeficiente de correlação (R^2).

A precisão do método foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliar a repetibilidade analítica, prepararam-se 6 amostras

que foram injetadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista e os resultados foram expressos em desvio padrão relativo (*DPR*). Para a determinação da precisão intermediária foram preparadas para cada dia 1 amostra em triplicata, que foram avaliadas em 2 dias diferentes por 2 analistas diferentes. As amostras foram injetadas em triplicata e os resultados expressos em *DPR*. Esse parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo, segundo a fórmula a seguir:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

O limite de detecção (*Ld*) é determinado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração. Entretanto, neste estudo os limites de detecção foram encontrados utilizando o software estatístico Action Stat.

4.9. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nas análises foram descartados conforme as normas para gestão de resíduos químicos nos laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental (SILVEIRA-NETA e PARACAMPO, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Seleção do método de extração

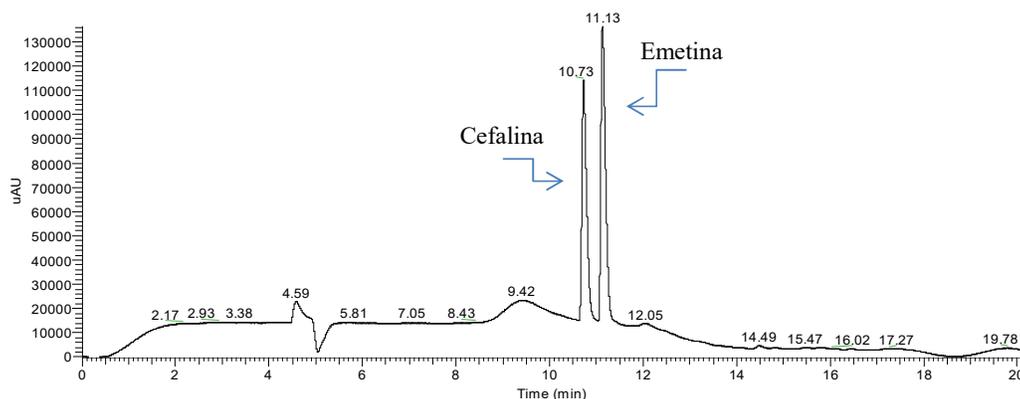
Segundo a literatura, a extração assistida por ultrassom é uma técnica de preparo de amostra que apresenta como vantagens: simplicidade, baixo custo, rapidez, baixo consumo de solvente e pequena quantidade de amostra (CARDOSO, 2018). Entretanto, verificou-se que os resultados obtidos a partir dessa técnica não foram precisos nos ensaios realizados, com desvio padrão relativo de até 51,86 %. Portanto, selecionou-se como técnica de extração a agitação em vortex, para a qual se observou valores de desvios padrões relativos para a repetibilidade dentro do preconizado pela RE N° 899, isto é, inferior a 5% (ANVISA, 2003).

5.3. Identificação de emetina e cefalina

Para a identificação dos alcaloides, foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos. A partir destas análises, por meio da comparação de seus tempos de retenção e espectros no UV com os

dos padrões autênticos de emetina e cefalina, foi possível fazer a quantificação dos teores dos marcadores químicos nos extratos dos órgãos da ipeca. Os tempos de retenção encontrados para os padrões de emetina e cefalina foram 11,13 e 10,73 min, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Cromatograma do padrão de emetina e cefalina. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.



As Figuras 13, 14 e 15 apresentam os cromatogramas da raiz, do caule e da folha da ipeca, respectivamente, sendo possível observar a presença dos marcadores químicos nesses órgãos. Já no cromatograma do extrato do fruto (Figura 16), só foi possível a identificação da emetina.

Figura 13 – Cromatograma do extrato da raiz obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.

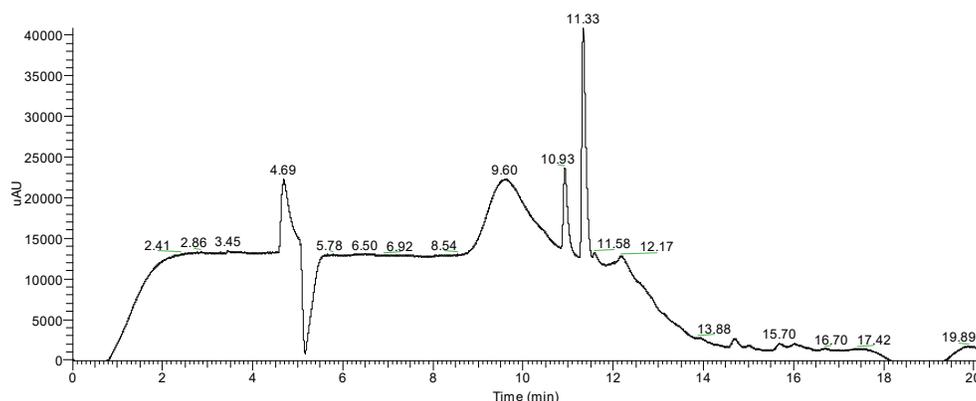


Figura 14 – Cromatograma do extrato do caule obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.

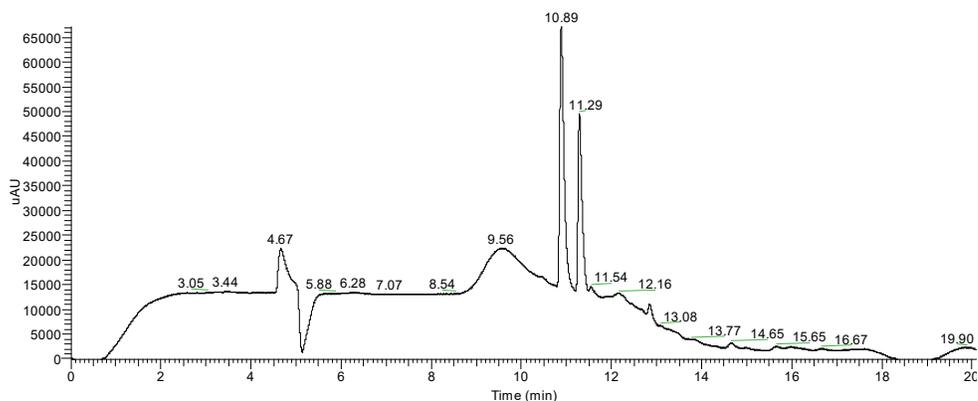


Figura 15 – Cromatograma do extrato da folha obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.

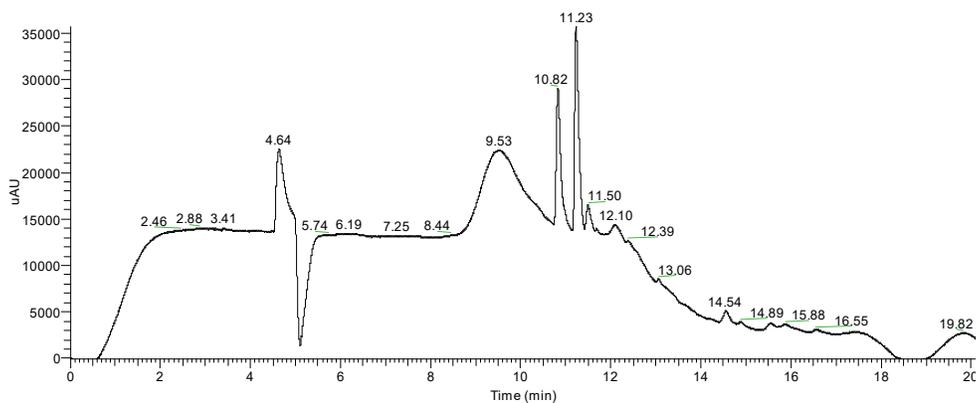
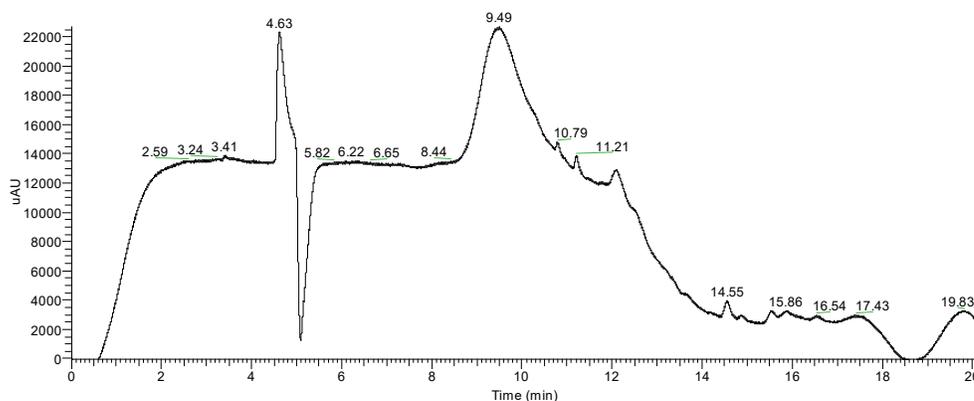


Figura 16 – Cromatograma do extrato do fruto obtido por agitação em banho de ultrassom. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.



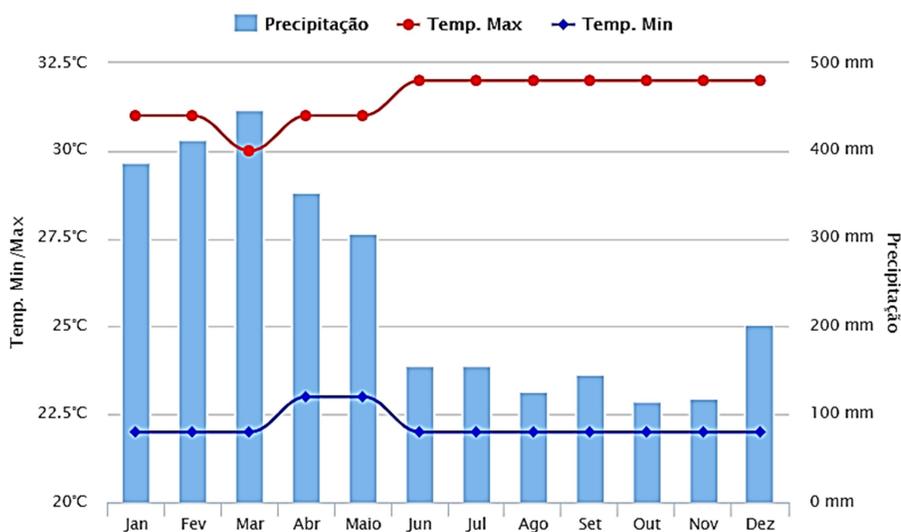
Por este resultado observado para o fruto, sugere-se que o teor de cefalina esteja abaixo do nível de detecção estimado para o método utilizado (Tabela 1). Além disso, resalta-se que a coleta da amostra foi realizada durante o mês de julho, mês com baixa incidência de chuvas (Figura 17), o que pode influenciar na produção dos metabólitos secundários. Segundo Lameira (2002), recomenda-se a coleta em períodos menos secos.

Tabela 1 – Valores de limite de detecção estimados para emetina e cefalina utilizando-se o software Action Stat a partir dos dados das curvas de calibração externa.

| PADRÃO | LIMITE DE DETECÇÃO (mg/mL) |
|---------------|-----------------------------------|
| Emetina | 0,0248 |
| Cefalina | 0,0214 |

Fonte: Elaboração do autor.

Figura 17 – Índice pluviométrico na cidade de Belém em 2019.



Fonte: <https://www.climatempo.com.br/climatologia/232/belem-pa>.

5.4. Quantificação de emetina e cefalina

Para a quantificação da emetina e cefalina utilizaram-se as curvas de calibração externa, cujas equações estão apresentadas na Tabela 2 e correlacionam, diretamente, com o teor desses alcaloides.

Tabela 2 – Equações da reta para os padrões de emetina e cefalina, onde y é a área sob o sinal e x é a concentração do marcador químico, expressa em mg/mL.

| Padrão | R ² | Equação da reta |
|----------|----------------|-----------------------|
| Emetina | 0,9944 | $y = 4E+06x - 3546,4$ |
| Cefalina | 0,9964 | $y = 3E+06x - 39803$ |

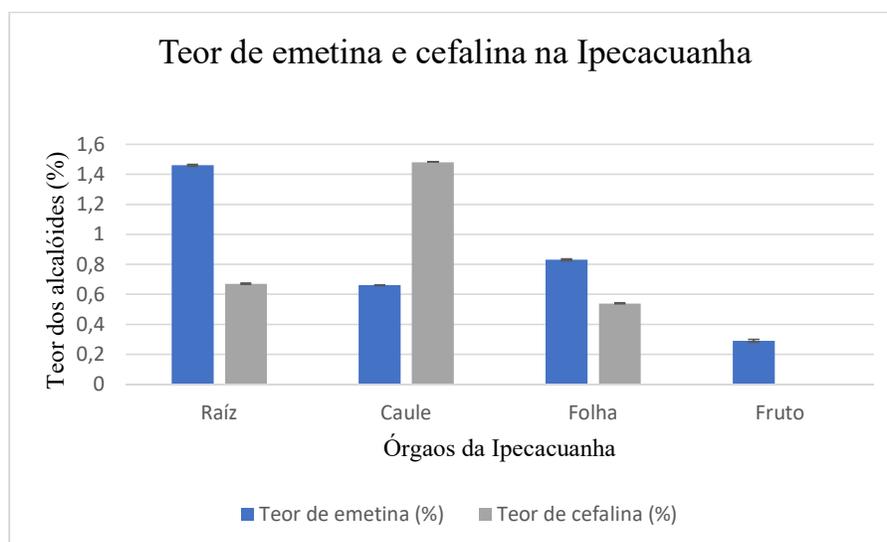
Fonte: Elaboração do autor.

As amostras foram coletadas na época de sua floração e segundo Pio-Corrêa (1984), o maior acúmulo dos alcaloides ocorre quando a planta está na época da floração, quando a planta está adulta, com aproximadamente 3 a 4 anos de idade. Vale ressaltar, que fatores como diversidade genética, temperatura do solo, disponibilidade de água, nutrientes, radiação UV e interação entre eles também podem afetar a

concentração de metabólitos secundários em plantas medicinais (GOBBO NETO, 2007).

Os teores de emetina e cefalina encontrados no extrato da raiz (Figura 18) são de 1,46% e 0,67%, respectivamente, calculados em base seca, o mesmo foi observado por Skorupa e Assis (1998) no qual descreveram, que os teores de emetina e cefalina a partir de raízes coletadas no Brasil são de 1,5-1,7% e 0,6-0,7%, respectivamente. Porém, esses valores podem variar em função da procedência, temperatura ambiente e idade da espécie (ASSIS e GIULIETTI, 1999).

Figura 18 – Teor de emetina e cefalina em diferentes órgãos de *Carapichea ipecacuanha*. Extratos obtidos por agitação em vortex, com exceção do fruto, e analisados por HPLC-DAD.



Fonte: Elaboração do autor.

Observa-se também que foi possível quantificar os marcadores químicos no caule, com 0,66% de emetina e 1,48% de cefalina, e na folha com 0,83% de emetina e 0,54% de cefalina. No fruto só foi possível a quantificação da emetina, com o teor de 0,29%. Contudo, não foi encontrado na literatura o teor dos alcalóides no caule, folha e fruto para a comparação de resultados.

De acordo com Chamerjee (1982), a emetina e a cefalina são encontradas em todas as partes da planta, mas em maiores concentrações em suas raízes, pois a parte aérea e o sistema radicular estão em constante competição pelas substâncias assimiladas ou sintetizadas, sendo que o sistema radicular é considerado um forte dreno, principalmente quando as plantas estão em deficiência nutricional (SALISBURY e

ROSS, 1992). Isso pode ser observado neste trabalho, no qual o extrato da raiz obteve o maior teor dos alcaloides analisados, evidenciando a busca pela raiz, o que acarretou no extrativismo predatório na raiz da *Carapichea ipecacuanha*.

Verifica-se (Figura 18) que o caule possui quantidades consideráveis de emetina (0,66%) e cefalina (1,48%). Entretanto, não se pode considerar como boa opção para a extração dos alcaloides, pois o caule é o responsável por transportar os nutrientes ao restante da planta (TAIZ e ZEIGER, 2013) e a ipeca é uma planta de pequeno porte, não possuindo muitos caules, o que conseqüentemente resultaria na morte da planta. Outra possibilidade seria a extração a partir do fruto, contudo não foi possível quantificar a cefalina e a emetina encontra-se em concentração menor que os demais órgãos (0,29%).

Em relação aos teores dos metabólitos secundários na folha, foram encontrados teores consideráveis de emetina e cefalina, com 0,83 % e 0,54%, respectivamente, o que representa uma ótima opção como matéria prima fonte desses alcaloides. Considerando-se que ao arrancar as folhas, os prejuízos à planta seriam menores, uma vez que as folhas são renovadas frequentemente (TAIZ e ZEIGER, 2013). Entretanto, são necessários maiores estudos para a utilização da folha, ampliando o número de amostras e utilizando um número maior de plantas de *Carapichea ipecacuanha*, pois nesse trabalho a quantificação foi realizada em órgãos de uma planta ou indivíduo apenas. Além disso, necessitam-se também estudos relacionados aos fatores que alteram a quantidade dos marcadores químicos nas folhas, visto que na literatura se encontram somente discussões sobre a raiz.

5.2. Validação do método

Os parâmetros de mérito foram determinados com base nos extratos da amostra 577 (raiz), obtido por agitação em vortex.

No parâmetro seletividade, compararam-se os tempos de retenção (Figura 19) e os espectros no UV (Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27) da amostra com os dos padrões de emetina e cefalina (Figuras 12, 20 e 21), e utilizou-se isso como indicação da presença dos compostos puros.

Figura 19 – Cromatograma do extrato da amostra 577 obtido por agitação em vortex. Coluna: LiChroCART® 250-4,6 Purospher® STAR RP-18E; temperatura da coluna: 21°C ± 2; fase móvel: (A) tampão acetato 0,25 M (pH = 5) e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,8 mL/min; volume de injeção: 10 µL; tempo de análise: 20 min; detecção: 280 nm.

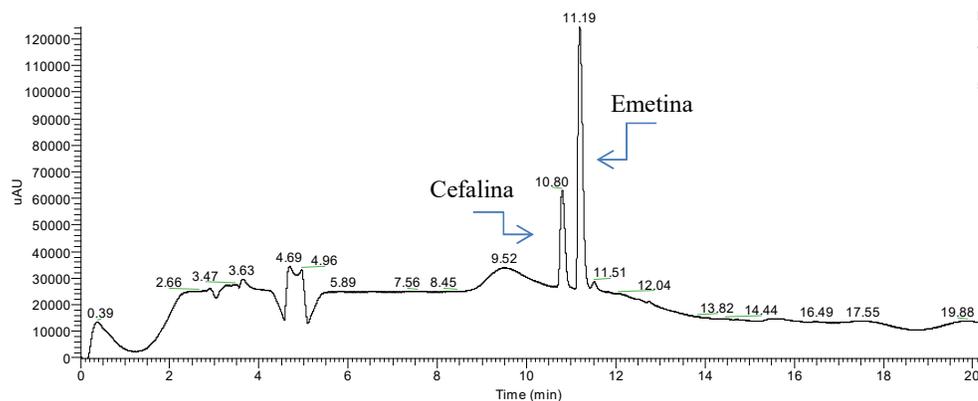


Figura 20 – Espectro no UV-Vis do padrão de cefalina.

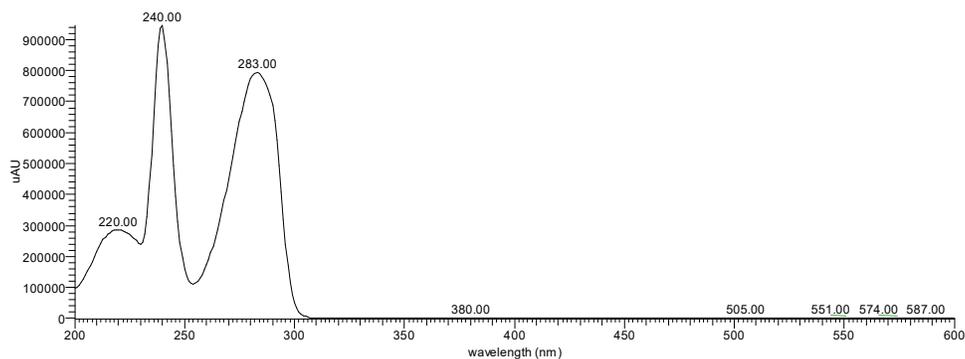


Figura 21 – Espectro no UV-Vis do padrão de emetina.

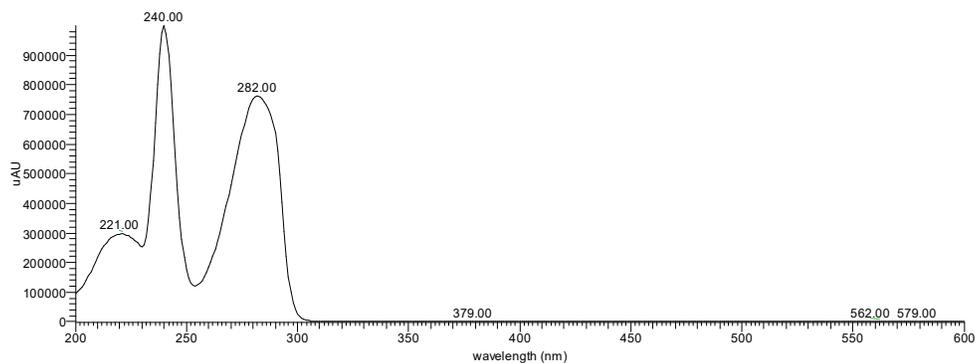


Figura 22 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no início do pico.

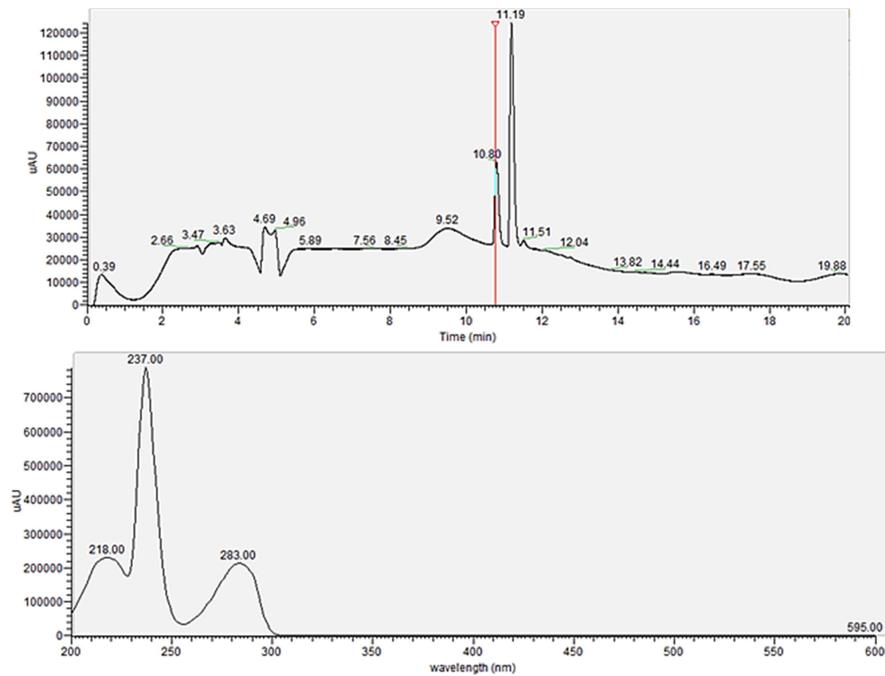


Figura 23 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no meio do pico.

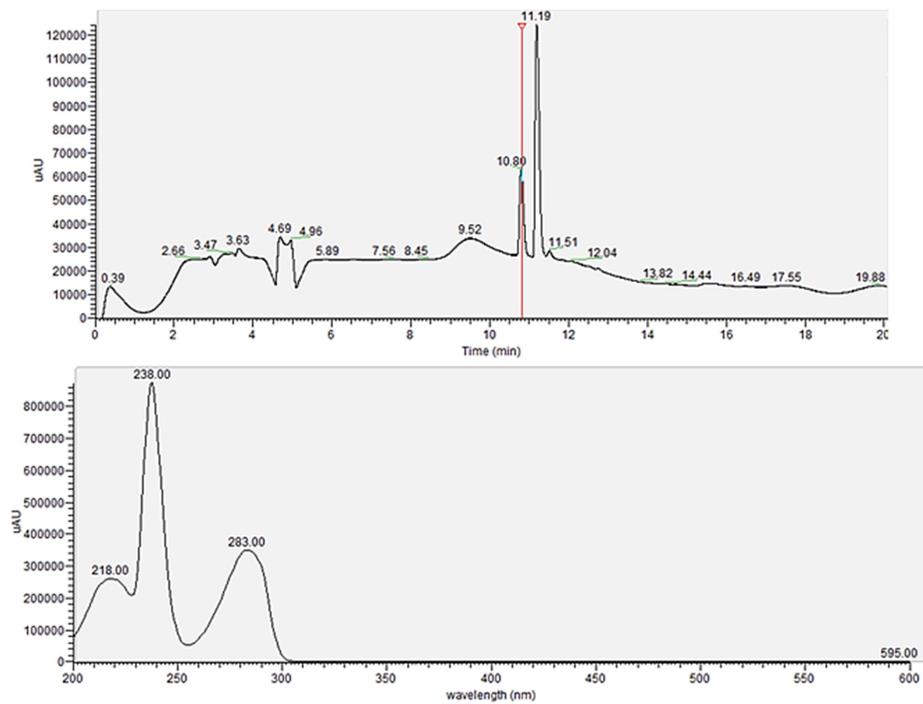


Figura 24 – Espectro no UV-Vis da cefalina do extrato da amostra 577 tomado no final do pico.

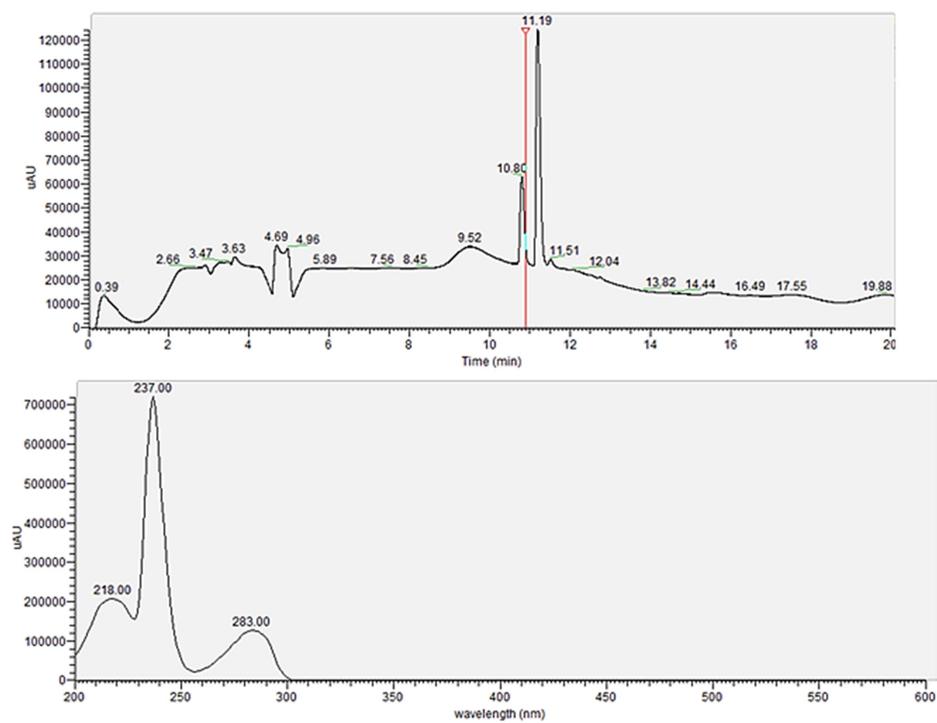


Figura 25 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no início do pico.

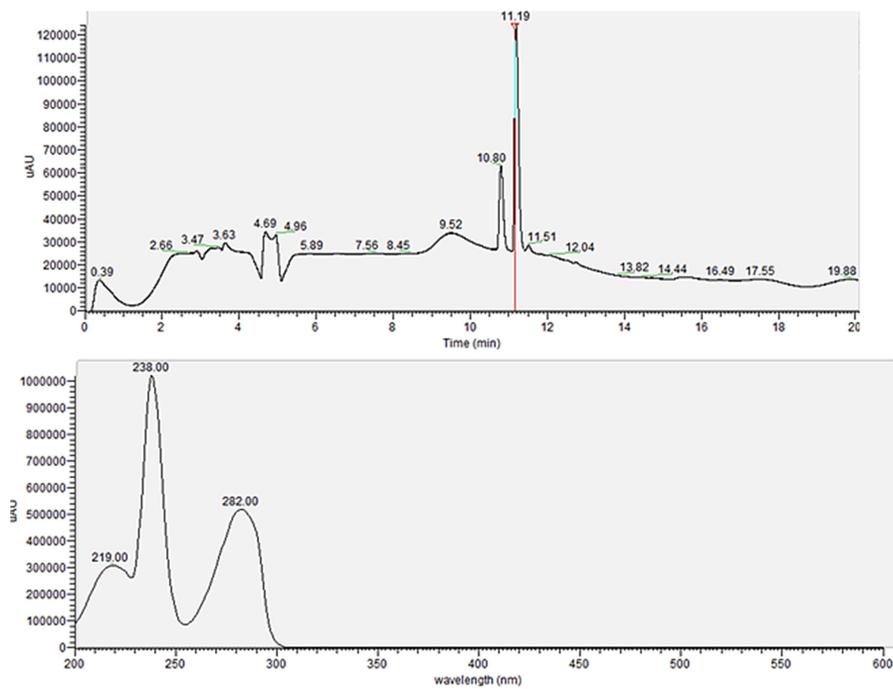


Figura 26 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no meio do pico.

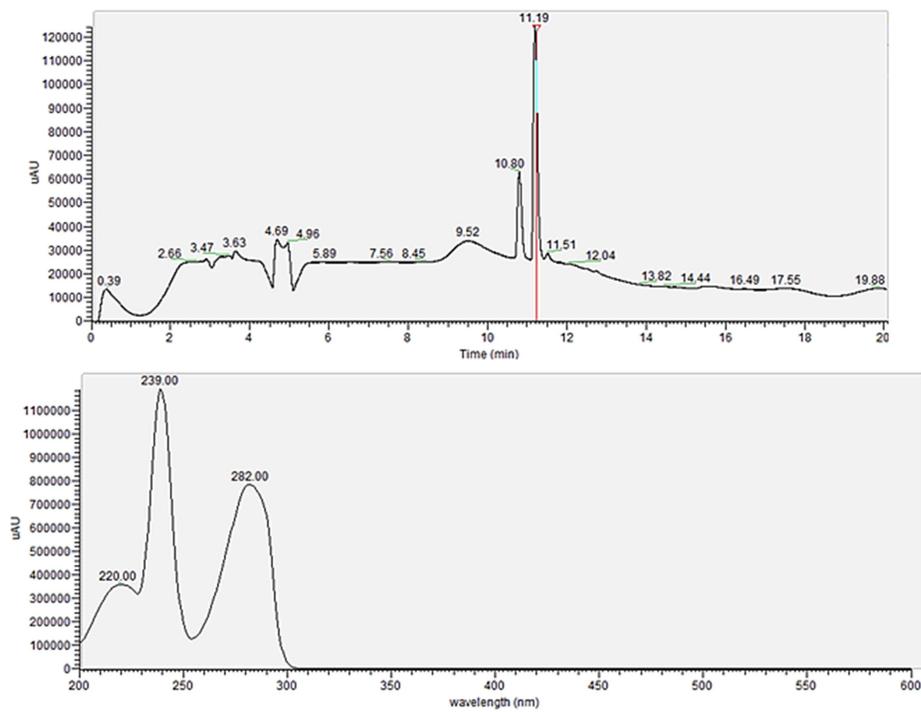
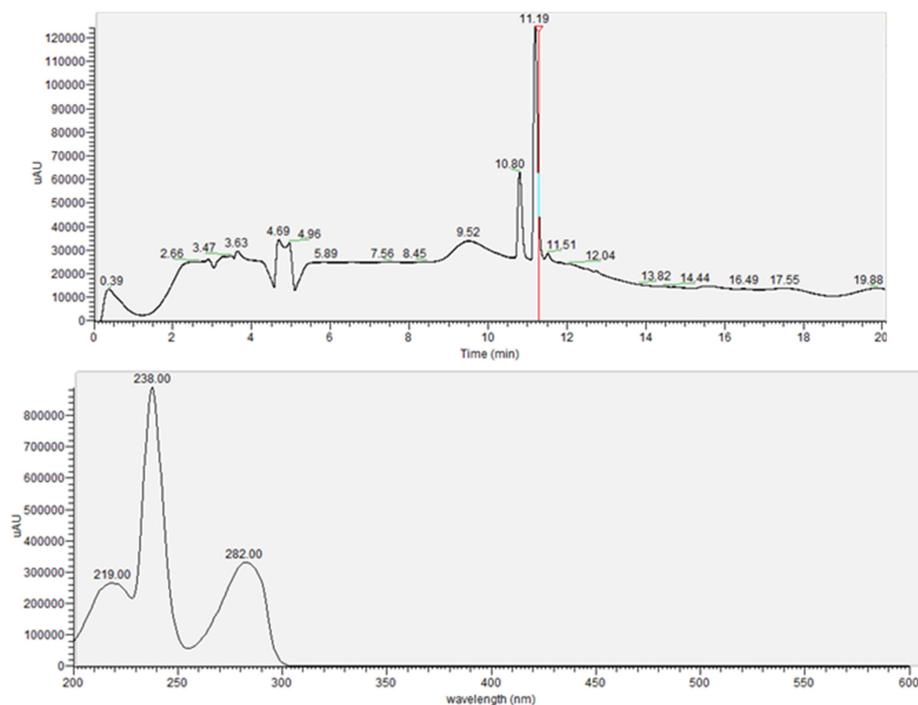


Figura 27 – Espectro no UV-Vis da emetina do extrato da amostra 577 tomado no final do pico.



A linearidade foi avaliada por meio da curva de calibração externa do padrão de emetina e cefalina, para as quais se obteve $R^2 = 0,9944$ para a emetina (Figura 28) e $R^2 = 0,964$ para a cefalina (Figura 29). Sendo ambas satisfatória, pois obteve-se $R^2 > 0,99$.

Figura 28 – Curva analítica para emetina.

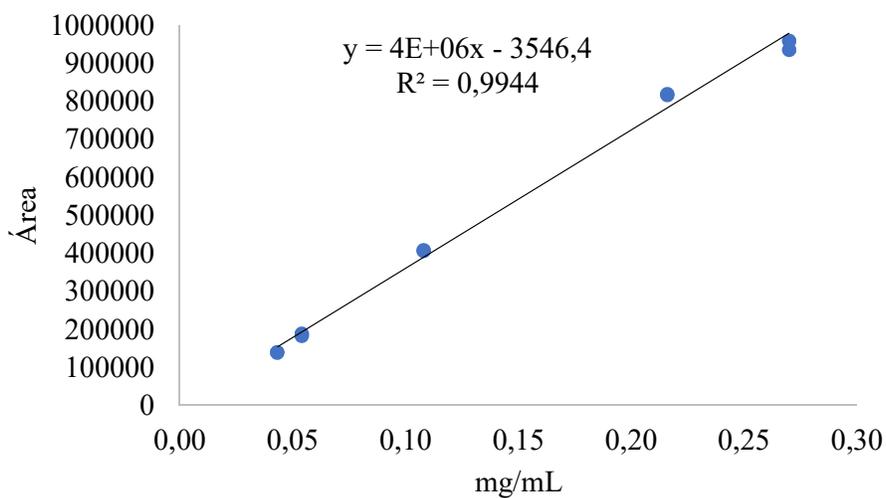
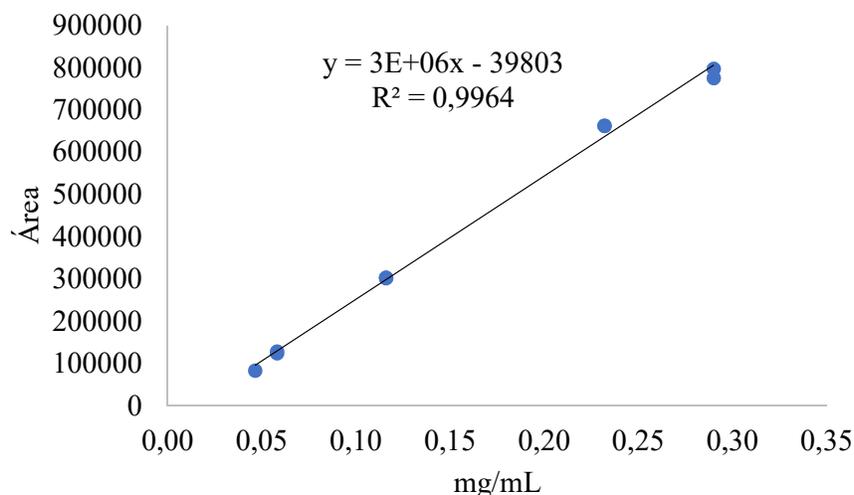


Figura 29 – Curva analítica para cefalina.



A precisão do método (Tabelas 3 e 4) foi avaliada em termos de repetibilidade a partir de seis determinações realizadas em um único dia com as mesmas condições de análise e pelo mesmo analista. Assim como em termos de precisão intermediária, as determinações foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

Os valores dos desvios padrões relativos obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação das agências reguladoras para métodos analíticos ($RSD \leq 5\%$) (ANVISA, 2003), o que indica que método analítico para quantificação simultânea de emetina e cefalina está sendo satisfatoriamente validado.

O parâmetro exatidão deverá ser avaliado para a conclusão do processo de validação.

Tabela 3 – Valores das concentrações médias, desvios padrões e desvios padrões relativos para avaliação de repetibilidade e precisão intermediária do método para quantificação de emetina.

| | Repetibilidade | Precisão intermediária |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Média (mg/mL) | 0,189 | 0,88 |
| Desvio padrão | 0,008 | 0,005 |
| Desvio padrão relativo | 3,97 | 2,70 |

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 4 – Valores das concentrações médias, desvios padrões e desvios padrões relativos para avaliação de repetibilidade e precisão intermediária do método para quantificação de cefalina.

| | Repetibilidade | Precisão intermediária |
|--|-----------------------|-------------------------------|
|--|-----------------------|-------------------------------|

| | | |
|-------------------------------|-------|-------|
| Média (mg/mL) | 0,072 | 0,071 |
| Desvio padrão | 0,002 | 0,002 |
| Desvio padrão relativo | 2,356 | 2,849 |

Fonte: Elaboração do autor.

O LD calculado pelo software Action Stat para o método demonstrou que o mesmo se mostra bastante sensível à detecção dos compostos de interesse, sendo estabelecido em 0,0248 mg/mL para emetina e 0,0214 mg/mL para cefalina.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, constatou-se a presença dos princípios ativos em outros órgãos da planta como caule, folha e frutos. Observou-se também que a folha contém quantidades apreciáveis de emetina e cefalina, e que poderia servir de fonte alternativa para a extração desses alcaloides, minimizando os prejuízos causados à planta no momento da colheita. Contudo, é necessário maiores estudos ampliando o tamanho da amostra, com a utilização de um número maior de espécimes de *C. ipecacuanha*. Portanto é coerente afirmar que os objetivos foram alcançados, pois foi possível analisar e comparar os teores de emetina e cefalina em raiz, caule, folha e fruto da *Carapichea ipecacuanha* e também a validação parcial do método por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação simultânea de cefalina e emetina em *Carapichea ipecacuanha*, atendeu o preconizado pela legislação.

REFERÊNCIAS

ASSIS, Marta Carvalho de. **Aspectos taxonômicos, anatômicos e econômicos da "ipeca" –Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes (Rubiaceae)**. 1992. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 1992.

ASSIS, Marta Carvalho de; GIULIETTI, Ana Maria. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, SP, v. 22, n. 2, p. 205–216, 1999.

ANVISA. Farmacopeia brasileira, Sexta Edição. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 1, n. 6, p. 873, 2019.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

BRUNETON, Jean. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris, 1995. 934 p.

CARDOSO, S. M. V. S. **Emprego da extração sólido-líquido assistida por ultrassom e HILIC-ESI-MS/MS na avaliação de amins biogênicas em amostras de pescado**. 2018. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2018.

CHAMERJEE, S. K.; NANDI, R. P.; GHOSH, N. C. Cultivation and utilization of ipecac in West Bengal. In: ATAL, C.K.; KAPUR, B.M. (Ed.). **Cultivation and utilization of medicinal plants**, 1982, Jammu-Tawi: Regional Research Laboratory Council of Scientific & Industrial Research, p. 295-301, 1982.

CHATTERJEE, S. K. Domestication studies of some medicinally important exotic plants growing in India. **Acta Horticulturae**, Índia, v. 331, p. 151-158, 1993.

COELHO, M. F.; TEIXEIRA, V.; RAB; ALBUQUERQUE, M. C. Propagação da poaia (*Psychotria ipecacuanha*) em diferentes substratos e posicionamento das estacas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 467-471, 2013.

COSTA, M. P. Crescimento e teor de emetina em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard.) obtidas in vitro e submetidas às condições de soluções nutritivas em casa-de-vegetação. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.24, n.1, p. 46-53, 2000.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, SP: Editora EdUfscar, 2001. 77 p.

DUARTE, G. C. A. **Estudo do Perfil Metabólico da *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (*Rubiaceae*) por Meio das Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução Assistida por Ferramentas Quimiométricas e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fotodiodos**. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

FCFRP/USP. Alcaloides. Disciplina de Farmacognosia, 2012.

GARCIA, R. M. A. **Variação sazonal do conteúdo de alcaloides e anatomia de raiz e caule de populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (*Rubiaceae*)**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HATFIELD, G. M.; ARTEAGA, L.; DWYER, J. D.; ARIAS, T. D.; GUPTA, M. P. An investigation of panamanian ipecac: botanical source and alkaloid analysis. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 4, p. 452-456, 1981.

HENRIQUES A. T., LIMBERGER R. P., KERBER V. A., M. P. R. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKE, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 641–677.

JHA, S.; SAHU, N. P.; MAHATO, B. Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta Medica**. v. 54, p. 504-506, 1988.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: Wiley, 2007. 1136 p.

LAMEIRA, O. A. Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. EMBRAPA, **Circular Técnica**, Belém, PA, n. 28, p. 1-4, 2002.

NETO, L. G. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

OLIVEIRA, L. O.; VENTURINI, B. A.; ROSSI, A. A. B.; HASTENREITER, S. S. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 86-93, 2010.

PAIVA, L. C. **Cultura e tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de *Petiveria alliaceae* L. visando a produção de substâncias bioativas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2011.

PELLETIER, S. W. **Alkaloids Chemical and Biological Perspectives**. New York, USA: Willey, 1983. 398 p.

PINTO, C. M. D. **A ipecacuanha**. In: Simpósio Internacional sobre plantas de interesse econômico de la Flora Amazonica. Costa Rica, 1976.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, 1984.

ROCHA, T.T.; LAMEIRA, O. L. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG ipecacuanha. **15º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2011.

SALISBURY, F.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Carlifornia, Wadsworth, 1992, 682 p.

SILVA, M. L. et al. Morfoanatomia dos sistemas gemíferos de poaia (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson) – Rubiaceae. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p. 9-17, 2015.

SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

SILVA, M. L.; **Cultivo agroflorestal de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes no território do baixo sul da Bahia**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

SILVERA NETA, J. J.; PARACAMPO, N. E. N. P. **Orientações técnicas para a gestão de resíduos químicos nos laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2012. 82 p.

SKORUPA, L. A.; ASSIS, M. C. Collecting and conserving ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. **Economic Botany**, v. 52, p. 209-210, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. **High-performance gradient elution. The practical application of the linear solvent strength model.** Wiley, 2007.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: EUFC, 1991. 416 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAYLOR, C. M.; GEREAU, R. E. The Genus *Carapichea* (Rubiaceae, Psychotrieae) 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, n. 1, p. 100-127, 2013.

TESHIMA, D.; IKEDA, K.; STAKE, M.; AOYAMA, T.; SHIMOMURA, K. Production of emetic alkaloid by in vitro culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 278-280, 1988.

TESHIMA, D.; TSUCHIYA, T.; AOYAMA, T.; HORIOKA, M. Quantitative determination of main emetic components (emetine and cephaeline) in ipecac. **Iyakuin Kenkyu**, v. 15, p. 63-71, 1984.

TEIXEIRA, V.A.; COELHO, M.F.B.; MING, L.C. Poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stoves]: aspectos da memória cultural dos poaieiros de Cáceres - Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de plantas medicinais.** v.14. n. 2. Botucatu, 2012.

TORRES, L. A. C. **Contribucion al conocimiento de la *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich., com especial referencia a Colombia.** In: Simposio Internacional sobre plantas de interesse econômico de la Flora Amazonica, Belém: IICA, 1972, p. 123-136.

VIDOTTI, C. C. F.; HOEFLER, R. Atualizando a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. **BOLETIM FARMACOTERAPÊUTICA**, Ano X, Número 02, 2005.

YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Emetic alkaloid formation in root culture of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 505-507, 1991.