

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

WALESKA DE FIGUEIRÊDO LEÃO

**Avaliação e validação de metodologias analíticas por UV-VIS e
CLAE-DAD para quantificação de antraquinonas nos frutos de
Senna angustifolia Vahl (FABACEAE)**

Recife
2015

WALESKA DE FIGUEIRÊDO LEÃO

Avaliação e validação de metodologias analíticas por UV-VIS e CLAE-DAD para quantificação de antraquinonas nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl (FABACEAE)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica na área de concentração: Território, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leão, Waleska de Figueirêdo

Avaliação e validação de metodologias analíticas por UV-VIS e CLAE-DAD para quantificação de antraquinonas nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl (Fabaceae)/ Waleska de Figueirêdo Leão– Recife: O Autor, 2015.

98 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia

- 1.** Plantas medicinais 2. Leguminosa I. Soares, Luiz Alberto Lira (orientador) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-187



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 25 de fevereiro de 2015

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 25 de fevereiro de 2015, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Karina Perrelli Randau
(Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Mariana Laundry de Mesquita
(Departamento de Farmácia – Universidade de Brasília)

Assinatura: _____

LEÃO, W. F.	Avaliação e validação de metodologias analíticas por UV-VIS e CLAE-DAD para quantificação de antraquinonas nos frutos de <i>Senna angustifolia</i> Vahl (FABACEAE)	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Mestrado	PPGIT/UFPE	2015
--------------------	---	--	----------	------------	------

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria da Conceição e Emmanoel Sérgio, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões e escolhas, pois mesmo longe fisicamente, estiveram sempre presentes com amor e apoio incondicional. A eles, meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, por estar sempre ao meu lado me dando forças, me guiando e me amparando em todos os momentos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares**, pela orientação e paciência, me conduzido aos caminhos da ciência de forma brilhante, desde os tempos da iniciação científica.

Um especial agradecimento à Professora **Dra. Karina Perrelli Randau**, a quem eu admiro muito. Obrigada por estar sempre presente, pela compreensão admirável e pelo apoio e ensinamentos compartilhados.

Aos meus queridos amigos do **Laboratório de Farmacognosia**, em especial à equipe da central analítica (**NUDATEF**) pela convivência maravilhosa, experiências compartilhadas e apoio. Agradeço, principalmente, aos meus companheiros **Marcos Galvão e Sarah Luanne**, pela colaboração e valiosa contribuição para a realização do trabalho. É muito bom trabalhar com vocês. Muito obrigada.

Às minhas amigas e irmãs **Suellen Ferreira, Marília Santana, Shirliane Silva, Renata Ribas e Janira Alves**, por todos os momentos de descontração que compartilhamos, por todo o incentivo nesta caminhada e pela amizade verdadeira.

À minha segunda família **Renata Amaral, Risoleta Nogueira e Sarah Luanne**, por estarem sempre me acompanhando, pelas noites de longas conversas de incentivo e por todo o apoio oferecido, vocês foram essenciais nessa minha caminhada.

Ao meu namorado e amigo **Osman Araújo**, por toda a ajuda, pela paciência nos momentos difíceis nessa fase tão importante da minha vida e por sempre me levantar quando eu pensava que não podia mais. Sei que posso contar com você em tudo. Muito obrigada!

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)** pela bolsa concedida

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum."

Frank Clark

RESUMO

LEÃO, W. F. Avaliação e validação de metodologias analíticas por UV-VIS e CLAE-DAD para quantificação de antraquinonas nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl (FABACEAE). 2015. 98f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Para que as plantas medicinais e os fitoterápicos apresentem parâmetros que conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade exigida para os medicamentos, é imprescindível a validação dos métodos de análise desses produtos, conforme estabelecido pelos órgãos sanitários. Baseando-se neste fato, o presente estudo visou avaliar metodologias analíticas para quantificação de Derivados Hidroxiantracênicos (DH) nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl, por espectrofotometria de absorção no visível (UV-VIS) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Adicionalmente, objetivou-se estabelecer especificações de qualidade para os frutos desta espécie através da sua caracterização físico-química (granulometria, perda por dessecação, teor de cinzas totais e insolúveis em ácido). A droga vegetal seca e triturada, após caracterização farmacognóstica, foi empregada no desenvolvimento e avaliação de método espectrofotométrico mais simples e de mais fácil execução para quantificação de DH totais baseado na reação de Bornträeger. Para o método cromatográfico adotou-se como ponto de partida procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. para separação e quantificação simultânea dos senosídeos A e B. Ambos os métodos foram validados quanto aos parâmetros preconizados pela RE nº899/2003 da ANVISA. Os métodos analíticos propostos apresentaram especificidade, seletividade e linearidade adequadas, baixos valores de Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ), precisão nos dois níveis analisados (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Por fim, os procedimentos analíticos estudados mostraram-se apropriados à quantificação dos derivados hidroxiantracênicos totais e dos senosídeos A e B nos frutos de *S. angustifolia* Vahl.

Palavras chave: *Senna angustifolia* Vahl. Derivados hidroxiantracênicos. Espectrofotometria no Visível. CLAE.

ABSTRACT

LEÃO, W. F. Evaluation and validation of analytical methods by UV-VIS and HPLC-DAD for the quantification of anthraquinones in the fruits of *Senna angustifolia* Vahl (FABACEAE). 2015. 98p. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

For medicinal plants and phytopharmaceutical present parameters that lead to reliable results and the appropriate quality required for medicines, validation of analytical methods such products is essential, as established by the health authorities. Based on this fact, the present study aimed at evaluating analytical methodologies for the quantification of hydroxyanthracene derivatives (HD) in the fruits of *Senna angustifolia* Vahl, by the visible absorption spectrophotometry and by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Additionally, It aimed to establish quality specifications for the fruits this species through the physicochemical characterization (particle size, loss on drying, content of total ash and acid-insoluble). The dried and crushed plant drug, after characterization Pharmacognostic, It was used in the development and evaluation of simpler and easiest spectrophotometric method to apply for quantification of total hydroxyanthracene derivatives based on the Bornträger reaction. For the chromatographic method was adopted as a starting point procedure described in the Brazilian Pharmacopoeia 5th Ed. for simultaneous separation and quantification of sennosides A and B. Both methods were validated as to the parameters recommended by the RE nº899/2003 from ANVISA. The proposed analytical methods have specificity, selectivity and adequate linearity, low values of Detection Limits (DL) and Quantification Limits (QL), precision in the two analyzed levels (repeatability and intermediate precision), accuracy and robustness. Finally, the analytical procedures studied showed to be appropriate for the quantification of total hydroxyanthracene derivatives and sennosides A and B in the fruits of *S. angustifolia* Vahl.

Keywords: *Senna angustifolia* Vahl. Hydroxyanthracene derivatives. Visible spectrophotometry. HPLC.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RE	Resolução Específica
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o teste de identificação dos derivados hidroxiantracênicos nos frutos de <i>S. angustifolia</i> em (CCD).....	45
Tabela 2 - Gradiente utilizado para análise de senosídeos nos frutos de <i>Senna angustifolia</i> Vahl.....	52
Tabela 3 - Teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido para a amostra de <i>S. angustifolia</i>	59
Tabela 4 - Avaliação do melhor solvente para a extração dos derivados hidroxiantracênicos em <i>Senna angustifolia</i>	60
Tabela 5 - Avaliação da influência do HCl 2M para hidrólise dos heterosídeos hidroxiantracênicos.....	61
Tabela 6 – Avaliação da concentração de NH ₄ OH como reagente para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos em <i>Senna angustifolia</i>	62
Tabela 7 - Avaliação das alíquotas de NH ₄ OH 100% como reagente para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos em <i>Senna angustifolia</i>	63
Tabela 8 - Teores obtidos nos três métodos testados para o doseamento de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de <i>Senna angustifolia</i> Vahl.....	65
Tabela 9 - Análise estatística para os coeficientes angulares (α) das curvas obtidas no ensaio da seletividade.....	68
Tabela 10 - Ensaio dos limites de detecção e quantificação calculados para os frutos de <i>Senna angustifolia</i>	70
Tabela 11 - Ensaios de precisão intracorrida para a amostra de <i>S. angustifolia</i>	71
Tabela 12 - Ensaios de precisão intercorrida para a amostra de <i>Senna angustifolia</i>	72
Tabela 13 - Teste de recuperação para a amostra de <i>Senna angustifolia</i>	72
Tabela 14 - Ensaio de robustez para a amostra de <i>Senna angustifolia</i>	73
Tabela 15 - Resultados dos limites de detecção e quantificação calculados para o senosídeo A e B nos frutos de <i>Senna angustifolia</i>	78
Tabela 16 - Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de senosídeos A e B nos frutos de Sena por CLAE.....	79
Tabela 17 - Resultados do ensaio de precisão intermediária do senosídeo A e B.....	80

Tabela 18 - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do senosídeo A na solução amostra dos frutos de <i>S. angustifolia</i>	81
Tabela 19 - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do senosídeo B na solução amostra dos frutos de <i>S. angustifolia</i>	82
Tabela 20 - Ensaio de robustez nos frutos de <i>S. angustifolia</i> por CLAE.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos senosídeos A e B, marcadores da espécie <i>Senna angustifolia</i>	28
Figura 2 -Núcleo básico das antraquinonas. Presença dos grupamentos OH nas posições C-1 e C-8, responsáveis pela atividade laxativa desses metabólitos.....	34
Figura 3 - Deslocamento do comprimento de onda em virtude da ionização das hidroxilas das antraquinonas na reação de Bornträger.....	36
Figura 4 - Histograma de distribuição granulométrica dos frutos de <i>S. angustifolia</i>	57
Figura 5 - Curva de retenção e passagem dos frutos de <i>S. angustifolia</i>	58
Figura 6 - Espectro de varredura da amostra de <i>S. angustifolia</i> faixa de 300 e 600 nm.....	59
Figura 7 - Cinética de reação dos derivados hidroxiantracênicos com NH ₄ OH.....	63
Figura 8 - Avaliação da proporção de droga:solvente nos frutos de <i>S. angustifolia</i>	64
Figura 9 - Avaliação da fração orgânica por cromatografia em camada delgada (CCD).....	65
Figura 10. Avaliação da eficiência de extração dos derivados hidroxiantracênicos através da CCD.....	66
Figura 11 - Ensaio de especificidade para o método espectrofotométrico.....	67
Figura 12 - Seletividade para o método espectrofotométrico.....	68
Figura 13 - Curvas de calibração para a amostra de <i>Senna angustifolia</i> (1) e para a solução padrão (senosídeos A e B) (2).....	69
Figura 14 -Espectro de varredura do pico do padrão de senosídeo A (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao senosídeo A na amostra de <i>S. angustifolia</i> (2).....	74
Figura 15 - Espectro de varredura do pico do padrão de senosídeo B (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao senosídeo B na amostra de <i>S. angustifolia</i> (2).....	75
Figura 16- Cromatogramas obtidos para a solução do padrão (senosídeos A e B) (1) e para a amostra dos frutos de <i>S. angustifolia</i> (2).....	75

Figura 17 -Curva de calibração média para a solução padrão do senosídeo A.....	76
Figura 18 -Curva de calibração média para a solução padrão do senosídeo B.....	77
Figura 19 -Curva de linearidade para o pico do senosídeo A em amostras de <i>S. angustifolia</i>	77
Figura 20 -Curva de linearidade para o pico do senosídeo B em amostras de <i>S. angustifolia</i>	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	REVISÃO DE LITERATURA DE <i>Senna angustifolia</i> Valh	26
3.1	ASPECTOS BOTÂNICOS	26
3.2	ASPECTOS FITOQUÍMICOS	28
3.3	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	30
3.4	ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	31
3.5	ANTRAQUINONAS	32
3.6	ANÁLISE QUANTITATIVA DE DERIVADOS HIDROXIANTRACÊNICOS EM ESPÉCIES VEGETAIS	35
3.6.1	ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL	35
3.6.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	37
3.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	42
4.2	REAGENTES E SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS DE <i>Senna angustifolia</i> VAHL.	42
4.3.1	Análise granulométrica por tamisação	42
4.3.2	Determinação da perda por dessecação	43
4.3.3	Determinação de cinzas totais	43
4.3.4	Determinação de cinzas insolúveis em ácido	44
4.4	MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS HIDROXIANTRACÊNICOS TOTAIS	44
4.4.1	Avaliação de métodos farmacopeicos	44
4.4.1.2	Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD)	45
4.4.2	Quantificação de antraquinonas pelo método de Bornträeger	45
4.4.2.1	Preparação da amostra para o método Bornträeger	45
4.4.2.1.1	Obtenção de fração enriquecida em antraquinonas	46
4.4.2.2	Solução dos padrões	46
4.4.2.3	Determinação da concentração da amostra e do comprimento de onda	47
4.4.2.4	Avaliação do líquido extrator	47
4.4.2.5	Avaliação da concentração do ácido sobre a performance do método	47

4.4.2.6	Avaliação da concentração de NH_4OH	47
4.4.2.7	Avaliação da alíquota de NH_4OH	48
4.4.2.8	Determinação do tempo de leitura	48
4.4.2.9	Avaliação da proporção droga:solvente	48
4.4.3	Validação do método espectrofotométrico	48
4.4.3.1	Especificidade	48
4.4.3.2	Seletividade	49
4.4.3.3	Linearidade	49
4.4.3.4	Limite de detecção e quantificação	50
4.4.3.5	Precisão	50
4.4.3.6	Exatidão	50
4.4.3.7	Robustez	51
4.5	MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SENOSÍDEOS A E B	51
4.5.1	Condições cromatográficas	51
4.5.2	Solução amostra.....	53
4.5.3	Solução padrão.....	53
4.5.4	Validação do método por CLAE	53
4.5.4.1	Especificidade	53
4.5.4.2	Linearidade	53
4.5.4.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	54
4.5.4.4	Precisão	54
4.5.4.5	Exatidão	55
4.5.4.6	Robustez	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	57
5.1.1	Análise granulométrica	57
5.1.2	Perda por dessecação.....	58
5.1.3	Cinzas totais e insolúveis em ácido.....	58
5.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	59
5.2.1	Obtenção da alíquota da amostra e comprimento de onda.....	59
5.2.2	Avaliação do líquido extrator	60
5.2.3	Avaliação da concentração do ácido sobre o desempenho do método	61
5.2.4	Avaliação da concentração de NH_4OH	61
5.2.5	Avaliação da alíquota de NH_4OH	62
5.2.6	Determinação do tempo de reação	63

5.2.7	Avaliação da proporção droga:solvente.....	64
5.2.8	Avaliação do desenvolvimento do método espectrofotométrico.....	64
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	67
5.3.1	Especificidade	67
5.3.2	Seletividade	67
5.3.3	Linearidade	68
5.3.4	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	69
5.3.5	Precisão	70
5.3.6	Exatidão	72
5.3.7	Robustez.....	72
5.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	73
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	74
5.5.1	Especificidade	74
5.5.2	Linearidade	76
5.5.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	78
5.5.4	Precisão	78
5.5.5	Exatidão	80
5.5.6	Robustez.....	83
6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas práticas da humanidade (AHMED; MURTAZA, 2015). As observações da população a cerca do uso e eficácia de plantas medicinais tem contribuído de forma significativa para a divulgação das propriedades terapêuticas de espécies vegetais (HAYTAA; MACIEL et al., 2002; POLATB; SELVIC, 2014). Plantas medicinais, preparações fito-farmacêuticas e fitofármacos representam um mercado que movimenta bilhões de dólares, o que representa uma parcela significativa no mercado de medicamentos, tanto em países industrializados como aqueles em desenvolvimento (GUERRA; NODARI, 2010). Niero (2010) afirma que cerca de 15% do capital da indústria farmacêutica mundial é representado por essas classes de medicamentos. Esse fato é decorrente do ritmo de crescimento das vendas internas desses produtos.

O interesse pela fitoterapia cresceu considerável nos últimos anos, tanto entre os pesquisadores, quanto os usuários ou serviços de saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS), afirmou que aproximadamente 75% da população mundial faz uso de recursos de origem vegetal para tratar diversas enfermidades (ALMEIDA; SCHEFFER, 2012). Para que se tenha uma ideia, entre todas as entidades químicas apresentadas à comunidade científica entre 1981 e 2006, 70% das moléculas eram provenientes de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Dessa forma, a população mundial continua utilizando plantas medicinais, mantendo a prática do consumo de fitoterápicos e fazendo com que as informações terapêuticas acumuladas durante vários séculos se tornem válidas. Apesar da cultura existente, o interesse contínuo de pesquisadores acerca deste tema, torna necessário a existência de estudos multidisciplinares mais aprofundados sobre plantas medicinais, envolvendo áreas que explorem os aspectos botânicos, farmacológicos e químicos de espécies vegetais com interesse medicinal, acrescentando informações fundamentais ao uso destas espécies como alternativas terapêuticas (LÓPEZ, 2006).

Entre as espécies vegetais de interesse medicinal e que são mais utilizadas pela população mundial destaca-se *Senna angustifolia* Vahl, conhecida como sene-de-tinnevely, sene-alexandrina, sena (sene), sena-indiana ou sena-arábica (KHAN et al., 2011; RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; SILVA et al., 2004). A espécie é originária

do Egito, mas também pode ser encontrada em abundância ao longo do sul da Índia (RAJ; BRITTO; KUMAR, 2011; SULTANA et al., 2012). Esta espécie possui potencial farmacológico, destacando sua atividade laxativa (GOPPEL; FRANZ, 2004; KURKIN; SHMYGAREVA, 2014; RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; SUN; SU, 2002; SILVA et al., 2008), principalmente em virtude da presença marcante de derivados hidroxiantracênicos (antraquinonas) em sua composição (DAVE; LEDWANI, 2012; GOPPEL; FRANZ, 2004; SUN; SU, 2002), sendo as substâncias diantronas-8-8'-diglicosídeos (senosídeos), considerados os marcadores analíticos e farmacológicos das espécies deste gênero (RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; VAN GORKOM et al., 1999).

Além desses metabólitos servirem como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, as pesquisas com plantas medicinais visam fornecer subsídios para a prática de uma fitoterapia racional, através do uso de medicamentos fitoterápicos de qualidade, com eficácia e segurança comprovada (CARVALHO et al., 2007). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o uso e venda dos medicamentos fitoterápicos de *Senna angustifolia* Vahl: Agiolax (nycomed), Plantax (farmion), Senan (aspen) e Tamarine (farmasa), que são padronizados pelo seu conteúdo de derivados hidroxiantracênicos para o tratamento da constipação. Muitas empresas farmacêuticas brasileiras produzem fitoterápicos que contêm essa droga e a disponibilidade de métodos de ensaio validados é uma parte importante do controle de qualidade desses produtos, além do que esses ensaios são exigidos pelas autoridades de saúde para o registro destes medicamentos.

Diversas técnicas têm sido empregadas para o doseamento dos derivados hidroxiantracênicos em materiais vegetais, dentre elas a espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), que se destaca por sua confiabilidade, simplicidade, robustez, custo relativamente baixo e grande números de aplicações desenvolvidas (KOMAROVA et al., 2009; MARQUES et al., 2013) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que compreende um procedimento analítico mais sensível e seletivo para fins quantitativos de substâncias isoladas (KOMAROVA et al., 2009).

Porém, vários métodos espectrofotométricos apresentam limitações no que se refere à sensibilidade, principalmente em matrizes complexas como espécies vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar a sobreposição das bandas,

impedindo a absorção do componente de interesse. Diversas estratégias têm sido propostas para o aumento da sensibilidade na espectrofotometria UV-Vis, como a utilização de métodos colorimétricos no tratamento das amostras a serem analisadas (CHANG et al., 2002; MARQUES et al., 2013). Desta forma, para a obtenção dos espectros dos derivados hidroxiantracênicos sem a interferência de outros compostos da matriz vegetal, pode-se utilizar a reação de Bornträeger. Esta técnica é a base teórica dos procedimentos descritos na literatura para identificar antraquinonas totais (COSTA, 1994; PEREZ; JIMENEZ; PULPEIRO, 2005; SAKULPANICH; GRITSANAPAN, 2009).

O método por CLAE é sensível e adequado para a rápida identificação e quantificação de constituintes de misturas complexas tais como em extratos de plantas (WYREPKOWSKI et al., 2014). Em relação ao método cromatográfico, até o presente momento, constata-se ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) com a descrição de um método por CLAE para quantificação dos senosídeos nos frutos de *Senna angustifolia*, sendo que nesta apenas encontra-se metodologia para as folhas da referida espécie, fazendo-se necessário a avaliação da aplicabilidade do método para os frutos e a validação do mesmo (HEFNAWY; SULTAN; AL-SHEHRI, 2006).

O desenvolvimento ou a adaptação de um método analítico implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como sua eficiência na rotina laboratorial. Esta confiabilidade e capacidade, que está sendo cada vez mais exigida pelos órgãos sanitários são confirmadas por um procedimento denominado validação, conforme preconizado pelo Guia para validação de métodos analíticos (RE nº 899/2003) (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Segundo a RDC 26 de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014), que regulamenta o registro de fitoterápicos, para que os produtos acabados apresentem parâmetros que conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade exigida para os medicamentos, é imprescindível validar os métodos de análise desses produtos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar dois métodos analíticos para quantificar os derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl, como forma de demonstrar a sua relevância dentro do campo da saúde, de forma que os resultados obtidos poderão ser empregados para o estabelecimento dos padrões mínimos de qualidade em todas as operações.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar e validar metodologias analíticas por Espectrofotometria no Visível e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para doseamento de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar caracterização físico-química (perda por dessecação, análise granulométrica e teor de cinzas totais e insolúveis em ácido) dos frutos de *S. angustifolia*;
2. Desenvolver e validar metodologia analítica espectrofotométrica no visível para doseamento de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *S. angustifolia*;
3. Avaliar e validar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para doseamento dos marcadores da espécie (Senosídeos A e B) nos frutos de *S. angustifolia*.

**REVISÃO DA LITERATURA DE *Senna*
angustifolia Valh**

3 REVISÃO DE LITERATURA DE *Senna angustifolia* Valh

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

FAMÍLIA FABACEAE

Senna angustifolia Vahl pertence à família Fabaceae, que é considerada a terceira maior em termos botânicos (KIRKBRIDE JÚNIOR; GUNN; WEITZMAN, 2003) e está distribuída por todo o planeta, com exceção dos pólos (FORERO, 2005). Espécies desta família originaram-se em condições tropicais de alta temperatura e umidade. Atualmente, a biodiversidade global desta família registra 19.325 espécies abrigadas em 727 gêneros, classificadas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (DUTRA; GARCIA; LIMA, 2008; LEWIS et al., 2005). No Brasil ocorrem 2.807 espécies (1.508 endêmicas) em 222 gêneros (LIMA et al., 2015).

Segundo Souza e Lorenzi (2005), as leguminosas estão bem representadas na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros e são encontradas na maioria das regiões e distribuídas por quase todas as formações vegetacionais (LIMA, 2000). Em importância econômica, equipara-se apenas a família Poaceae (GUNN, 1984) e é considerada a mais evoluída entre as Leguminosas (CRONQUIST, 1988). Historicamente, representantes de Leguminosae têm sido amplamente empregados como fonte de recursos para os mais diversos fins, há espécies forrageiras (gêneros *Medicago* e *Melilotus*), madeireiras (gêneros *Andira* e *Dalbergia*), medicinais (gêneros *Bauhinia* e *Senna*), produtoras de resinas, tintas e bases de vernizes (gêneros *Hymenaea* e *Copaifera*), ornamentação (gêneros *Bauhinia*, *Caesalpinia* e *Cassia*), entre outros, compondo, assim, um grupo numeroso de espécies de importância econômica, ecológica e medicinal (LEWIS et al., 2005).

GÊNERO *Senna*

Segundo Judd e colaboradores (2009) este gênero é composto por aproximadamente 250 espécies, as quais estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, e neste número estão inclusos arbustos, árvores e ervas. É o segundo mais numeroso gênero da subfamília Caesalpinioideae, com 206 espécies nativas para as Américas, 25 delas são amplamente distribuídas na América do Sul e,

das 80 espécies registradas no Brasil, 26 são endêmicas do país. O maior centro de dispersão é o Brasil central (LEWIS et al., 2005; SOUZA; BORTOLUZZI, 2013).

O gênero *Senna*, juntamente com *Cassia* e *Chamaecrista*, está alocado em Cassieae, uma das quatro tribos da subfamília Caesalpinioideae (LEWIS et al., 2005). Estes gêneros foram separados, havendo a transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Irwin e Barneby (1982) defenderam a mudança baseando-se no argumento de que *Cassia* é claramente um grupo isolado e que as diferenças entre os três grupos, dentro dele, são tão grandes ou mesmo maiores do que aquelas que delimitam alguns gêneros dentro da família Leguminosae.

Segundo Irwin e Barneby (1982), *Senna* distingue-se de *Cassia* principalmente pela presença de filetes retos, mais curtos ou até duas vezes o comprimento das anteras, pelas anteras basifixas e nectários extraflorais na maioria das espécies. Os mesmos autores consideram a diferença entre os gêneros no porte, na presença ou não de bractéolas e de nectários e nas características do androceu e do fruto. A presença de nectários extraflorais em ráquis de espécies do gênero *Senna* é corroborada por McKey (1989).

Espécies de *Cassia*, juntamente com aquelas com sinonímia *Senna* ou com algumas que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica adotado, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VIEGAS JR et al., 2006).

A ESPÉCIE *Senna angustifolia* Vahl

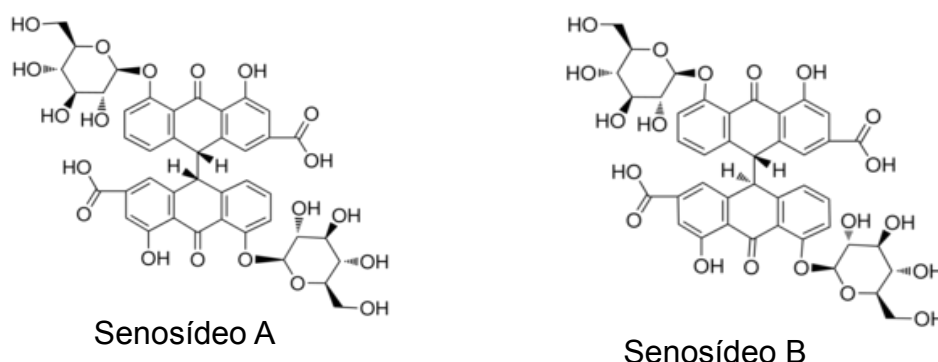
Senna angustifolia Vahl está entre as espécies medicinais mais utilizadas pela população mundial. É um pequeno arbusto que atinge cerca de 1 m de altura, com caule ereto, lenhoso e de flores amarelas (ROCHA; ROCHA, 2006). Possui como sinonímia científica a nomenclatura de *Senna alexandrina* P. Miller e é conhecida como sene-de-tinnevely, sena (sene), sena-indiana ou sena-arábica (KHAN et al., 2011; RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; SILVA et al., 2004). É originária do Egito, mas também pode ser encontrada em abundância ao longo do sul da Índia (RAJ; BRITTO; KUMAR, 2011; SULTANA et al., 2012).

Senna angustifolia pode ser cultivada em todos os tipos de solos, e por ser basicamente uma planta de ambiente árido pode sobreviver em ambientes quentes e

áreas subtropicais, sendo normalmente cultivada em áreas de sol brilhante e chuvas escassas (HUSSAIN et al., 2007).

Essa espécie é largamente utilizada como laxante e para o tratamento de tumores e distúrbios digestivos, depressão, asma, eczemas e outras doenças da pele (SULTANA et al., 2012). O potencial farmacológico de *Senna* é sua atividade laxativa (GOPPEL; FRANZ, 2004; KURKIN; SHMYGAREVA, 2014; RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; SILVA et al., 2008; SUN; SU, 2002), principalmente em virtude da presença marcante de derivados hidroxiantracênicos (antraquinonas) em sua composição (DAVE; LEDWANI, 2012; GOPPEL; FRANZ, 2004; SUN; SU, 2002), sendo as substâncias diantronas-8-8'-diglicosídeos (senosídeos) (Figura 1), considerados os marcadores analíticos e farmacológicos das espécies deste gênero (RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; VAN GORKOM et al., 1999).

Figura 1 – Estrutura dos senosídeos A e B, marcadores da espécie *Senna angustifolia*.



Segundo Peron e colaboradores (2008), os chás de *S. angustifolia* são muito utilizados pela população em geral devido às suas propriedades terapêuticas, é indicada na prisão de ventre, em situações em que se quer um esvaziamento intestinal (exames radiográficos, pré e pós-operatórios). Dentre as partes da planta que são utilizadas como matérias-primas nas indústrias farmacêuticas estão as folhas secas e as vagens (frutos) (PERON et al., 2008).

3.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

As espécies que compõem a família Fabaceae, em especial as que fazem parte do gênero *Senna*, vêm sendo amplamente estudadas do ponto de vista químico, revelando uma vasta diversidade de substâncias bioativas, com padrões estruturais

variados, derivadas do metabolismo secundário. A literatura enumera mais de 350 compostos em espécies deste gênero, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de várias partes do mundo. Estes estudos evidenciaram a ocorrência de diversas classes de metabólitos, sendo as antraquinonas, flavonoides e outros compostos fenólicos os grupos químicos mais frequentes na maioria das espécies (FARAG et al., 2015; VIEGAS JR et al., 2006).

Os principais constituintes de *Senna angustifolia* Vahl são as diantronas-8-8'-diglicosídeos chamados senosídeos A-F, com predomínio dos senosídeos A e B (PERON et al., 2008; RAJU; SHAH; GAJBHIYE, 2013; VAN GORKOM et al., 1999). Outro glicosídeo antraquinônico, denominado de emodina 8-O-suforosídeo e sete glicosídeos previamente elucidados, foram isolados a partir das folhas de *S. angustifolia* (KINJO et al., 1994). Em estudo realizado por Gupta (2008), dois glicosídeos naftalenos também foram isolados a partir de folhas e vagens.

Espécies do gênero *Senna* também se caracterizam pela presença de outras substâncias antraquinônicas livres e combinadas: crisofanol, aloe-emodina, antranol, reína, reína-8-glicosídeos, reína diglicosídeo e reína antrona-8-glicosídeo (OLIVEIRA et al., 2012). Estes constituintes têm sido extraídos de folhas, caules, frutos, brotos e flores (UPADHYAY et al., 2011).

Dentre os flavonoides mais comumente relatados em *S. angustifolia* estão canferol, canferitrina e isoramnetina (LAGHARI et al., 2011). No mesmo estudo realizado por Laghari e colaboradores (2011) foram isolados em flores e folhas de *S. angustifolia* os flavonoides Epicatequina, (-)-(2S)-6-metoxi-[2",3":7,8]-furanoflavanona, Canferol 3-O-sulfato-7-O-c-arabino-piranosido, (2S)-7,8,bis-3',4'(2,2-dimetil-cromano)-5-hidroxiflavanona, 3,7- dihidroxi-4', 8-dimetoxiflavona e 14-hidroxi artonina e o metabólico fenólico Vidalenolona.

Além disso, também foi descrita a presença de β -sistosterol em *S. angustifolia* (UPADHYAY et al., 2011). Alguns óleos essenciais também foram obtidos das partes aéreas de *S. angustifolia*. Estudos realizados por Makky e colaboradores (2012) exibiram os seguintes compostos presentes no óleo essencial: α -pineno, β -pineno, octanol, γ terpinoleno, stragole, óxido de cis-limoneno, trans-anetol, β -cariofileno, óxido cariofileno, geranil hexanolato e ácido palmítico.

Recentemente, Epifano e colaboradores (2014) isolaram os compostos antraquinônicos madagascina (3-isopenteniloxiemodina) e 3-geraniloxiemodina de

folhas secas e frutos de *Sene*. Ambos os compostos foram descritos pela primeira vez na espécie.

3.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Diversos estudos destacam espécies de *Senna* tais como *S. angustifolia*, *S. auriculata*, *S. autifolia*, *S. cinnamon*, *S. fistula*, *S. nigricanense*, *S. nodosa*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis*, *S. sophera* e *S. torosa* em virtude da utilização popular disseminada das mesmas em algumas regiões da África, Ásia e Índia, devido as suas atividades laxativa e purgativa; além disso, estudos farmacológicos com algumas destas espécies comprovaram também propriedades antibacteriana e antifúngica (PALAMICHAMY; AMALA; NAGARAGAN, 1991; SAMY; IGNACIMUTHU, 2000), hepatoprotetora e antimalárica (VIEGAS JR et al., 2006). Extratos metanólicos das sementes de espécies de *Senna* também demonstraram potencial antioxidante, uma vez que apresentaram atividade semelhante a do alfa-tocoferol (CHAKRABARTY; CHAWLA, 1983).

A atividade antioxidante foi comprovada em folhas e flores de *Senna angustifolia* por estudos realizados por Laghari e colaboradores (2011). Extratos metanólicos de dez espécies de *Senna* foram avaliados (400 µg/mL) e apresentaram efeito na inibição de bactérias e fungos. Dentre estes, os extratos referentes às espécies *S. angustifolia* e *S. alata*, demonstraram 100% de inibição no crescimento de *Staphylococcus pyogenes* e *Corynebacterium diphtheriae* (ALI et al., 1999). Em outros estudos, realizados por Makky e colaboradores (2012), a atividade antibacteriana de *S. angustifolia* foi confirmada através da inibição do crescimento de cepas de *Alcalignes xylosoxidans* e *Staphylococcus xylosus*.

Extratos alcoólicos das sementes de espécies de *Senna* inibiram o crescimento das cepas bacterianas *Micrococcus pyogenes* var. *albus*, *Micrococcus citreus*, *Cornibacterium diphtheria*, *Bacillus megatherium*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella schottmuelleri* e *Escherichia coli* (MUKHARJEE et al., 1996; SINGH; KHAN, 1990).

O extrato das folhas de *Senna angustifolia* inibiu o crescimento de fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Sachharomyces cerevisiae* e *Trichophyton mentagrophyte*. Esta atividade foi atribuída à presença do crisofanol e do ácido crisofânico-9-antrona e de outras antraquinonas como emodina e reína (LEMLI;

CUVEELA, 1974). Foi testada a atividade antifúngica de uma saponina isolada das sementes de *S. angustifolia* e o extrato butanólico atingiu máximo de inibição frente à cepa *Colletotrichium dematium* (KHAN; SRIVASTAVA, 2009).

Gill e colaboradores (2011) observaram ainda atividade antiulcerogênica em extratos metanólicos de sementes de espécies do gênero *Senna*, onde houve uma redução significativa do índice de úlcera, bem como a produção de ácido gástrico em animais tratados com o extrato em relação aos animais controle.

A atividade antiulcerogênica do extrato metanólico das cascas de *S. angustifolia* (800 mg/kg) foi igual ao efeito produzido por 5mg/kg de ranitidina, no modelo do estudo, elaborado por Mohanty e colaboradores (2010). A administração oral do extrato metanólico (800 mg/kg) da casca de *S. angustifolia* mostrou inibição completa de ulceração e redução significativa da acidez livre, atividade total da acidez péptica e volume de suco gástrico secretado.

3.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Devido a sua origem natural, baixa toxicidade oral aparente, efetividade e acessibilidade sem prescrição médica, os laxantes que possuem antraquinonas em sua composição são um remédio popular para a constipação e são frequentemente utilizados de forma abusiva sendo, portanto, importante caracterizar os seus efeitos nocivos e/ou tóxicos.

A espécie do gênero *Senna* mais comumente utilizada pelo efeito laxativo que produz proveniente da presença de antraquinonas é *Senna angustifolia* Vahl (Sene). Esta espécie tem sido usada de forma abusiva no preparo de chás ou infusões para uso oral, com a promessa de melhorar o aspecto da pele e emagrecimento. Entretanto, a má utilização desta (uso prolongado/crônico), pode ocasionar efeitos adversos imediatos, como: cólicas estomacais, náusea, vômito, diarreia prolongada ou efeitos crônicos (dor e constipação) devido a dependência do laxativo, ou alterações mais graves como fraqueza, desidratação e desordens eletrolíticas e, em determinadas circunstâncias, lesões hepáticas (NADIR; REDDY; VAN THIEL, 2000).

Estudos toxicológicos realizados com *Senna occidentalis* mostram que potencialmente podem causar alterações cardíacas e hepáticas em coelhos (TASAKA, 2000) e miopatia em frangos e bovinos (CALORE et al., 2000). Lesões

cardíacas de caráter degenerativo e necrótico, porém menos severas que na musculatura estriada, também são descritas (BARROS et al., 1999).

Hepatotoxicidade grave é incomum, mas foi evidenciada em *Senna angustifolia* e pode ser explicada pela exposição do fígado a quantidades excessivas de metabolitos tóxicos de glicosídeos de antraquinonas (SOYUNCU; CETE; NOKAY; 2008). Entretanto, Vitalone e colaboradores (2011) realizaram um estudo de toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato das folhas de *S. angustifolia* (padronizado em 60% de senosídeos) e observaram falta de hepatotoxicidade desta espécie em doses mais elevadas do que as geralmente utilizadas em seres humanos.

É possível que as antraquinonas presentes em espécies do gênero *Senna* possam ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon. No entanto, deve-se considerar fatores relacionados ao histórico dos pacientes, seus hábitos alimentares, uso concomitante de outras substâncias laxativas, severidade do quadro de constipação e histórico familiar (MORALES et al., 2009).

Entretanto, estudos realizados por Lira e colaboradores (2005) em camundongos, usando raízes da planta, demonstraram ausência de efeitos tóxicos com doses de até 500 mg/kg. Em geral, extratos obtidos com matéria prima de sene têm apresentado baixa toxicidade em testes com animais, indicando que em curto prazo a utilização deste agente laxante é segura (BRUSICK; MENGES, 1997).

Morales e colaboradores (2009) ao revisar a informação que surge em várias bases de dados científicos médicos sobre a toxicidade de *Senna*, concluem que: a evidência atual não mostra que há um risco genotóxico para os pacientes que tomam laxantes contendo extratos de *Senna* ou senosídeos; não há evidências convincentes de que o uso crônico de *Senna* tem uma alteração estrutural e/ou funcional do sistema nervoso entérico ou o músculo liso intestinal; não há nenhuma relação de um extrato de Sene e o aparecimento de tumores gastrointestinais ou qualquer outro tipo, em ratos; e, por fim, o extrato dos frutos de *Senna* não é carcinogênico em ratos, mesmo depois de uma dose diária de dois anos de até 300 mg/kg/dia. Este último resultado mostra-se em concordância com os obtidos por Mitchell e colaboradores (2006).

3.5 ANTRAQUINONAS

Considerando o fato que as quinonas/antraquinonas constituem um caráter quimiotaxonômico nas espécies do gênero *Senna* (FALKENBERG, 2007;

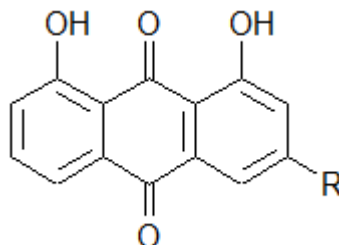
RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009) e que as mesmas são responsáveis pela atividade biológica de maior destaque (laxante), faz-se necessário conhecer um pouco a cerca desta classe de metabólitos.

Assim, as quinonas são consideradas compostos orgânicos, provenientes da oxidação de fenois. Desde a antiguidade, plantas que possuem quinonas em sua composição química têm sido usadas devido as suas atividades biológicas ou como fonte de corantes naturais nas indústrias têxteis e alimentícias (MALIK et al., 2010). Os principais grupos das quinonas são: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, e estes são classificados em função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligações duplas e cetonas conjugadas está inserido (SIMÕES et al., 2007).

Nesse contexto, as antraquinonas ou ainda, antranoides, derivados antracênicos ou derivados hidroxiantracênicos, como também são conhecidas, são definidas como substâncias fenólicas derivadas da dicetona do antraceno, e destacam-se das quinonas por estarem em maior quantidade na natureza e pela sua importância para a indústria farmacêutica (SIMÕES et al., 2007).

As antraquinonas e antronas são caracterizadas farmacologicamente por apresentarem ação laxativa, quando administrada em pequenas doses, e purgativa, quando em doses maiores. Estas atividades são atribuídas à presença dos grupamentos hidroxilas presentes nas posições C-1 e C-8 (Figura 2). Estes compostos podem ser encontrados na natureza em sua forma livre ou glicosilada (C- ou O-heterosídeos) (COSTA, 1994; FALKENBERG, 2007; HARNISCHFEGER; STOLZE, 1983; VAN OS, 1976). As antraquinonas podem ser reduzidas à antrona e, de maneira geral, ocorrem no início do período vegetativo das plantas, depois, no fim do período de desenvolvimento anual. Além disso, as antronas podem sofrer dimerização, originando as diantronas (COSTA, 1994; HARNISCHFEGER; STOLZE, 1983).

Figura 2 - Núcleo básico das antraquinonas. Presença dos grupamentos OH nas posições C-1 e C-8, responsáveis pela atividade laxativa desses metabólitos.



Fonte: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/antraquinonas.html>.

Laxantes deste tipo bloqueiam a reabsorção de sódio através do bloqueio da enzima ATPase dependente de Na^+/K^+ (efeito anti-reabsortivo). Ao mesmo tempo, promove, em diferentes condições, a passagem de eletrólitos e água na luz intestinal (efeito hidragogo) (IZZU et al., 1999). Yagi e colaboradores (1991) também destacam que no cólon maior, os senosídeos são metabolizados pelas enzimas bacterianas da microbiota intestinal, originando a reinantrona, metabólito ativo responsável pelo efeito laxante. São também empregados terapeuticamente como catárticos, por irritar o intestino grosso, aumentando a mobilidade intestinal e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção de água (IZZU et al., 1999).

As antraquinonas também atuam como antioxidantes e captadoras de radicais livres, podendo exibir atividade antiprotozoária. Também já foi citada sua atividade inibitória sobre o crescimento de *Helicobacter pylori*, bactéria associada ao surgimento de câncer gástrico (CAMACHO et al., 2000). Várias antraquinonas, entre as quais a emodina, têm mostrado atividade antiviral e antimicrobiana, antifúngica, citotóxica (BABU et al., 2004), bem como efeitos analgésicos (KUMAR; DHAWAN; AGGARWAL, 1998). Isto torna os compostos potencialmente úteis em diversas aplicações médicas (BOONCHAI et al., 2006).

Apesar de todas estas atividades biológicas relatadas, as antraquinonas também apresentam efeitos prejudiciais, como genotoxicidade, mutagenicidade e hepatotoxicidade, além de desencadear o aparecimento de tumores. Nesse sentido, é necessário ter cautela quanto ao uso das espécies que possuem estes metabólitos em sua composição e estudos adicionais precisam ser realizados para definir as

atividades de cada componente com mais precisão (CHOI; CHUNG, 2003; MA et al, 2014).

3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DE DERIVADOS HIDROXIANTRACÊNICOS EM ESPÉCIES VEGETAIS

3.6.1 ESPECTROFOTOMETRIA NO VISÍVEL

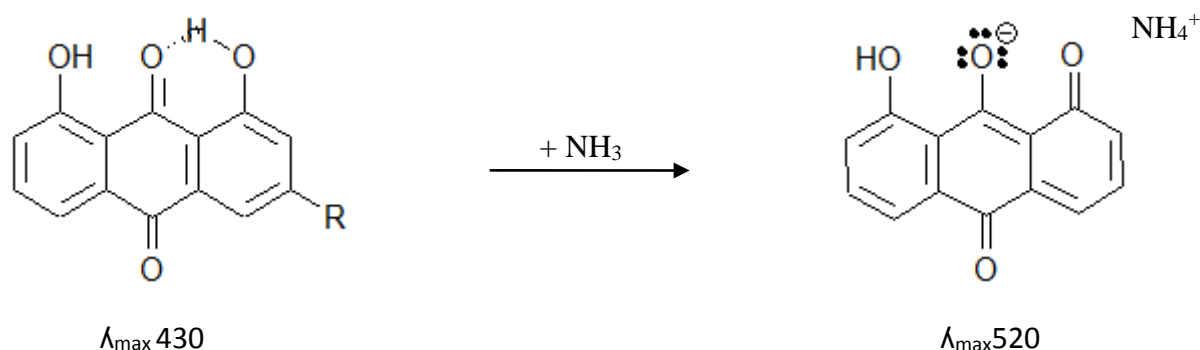
A espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) é muito utilizada nos laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade no que diz respeito às técnicas de análises quantitativas, por sua confiabilidade, simplicidade, robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (ABADI et al., 2012; MARQUES et al., 2013). Esta técnica é frequentemente utilizada nas determinações analíticas em diversas áreas e é aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na quantificação do princípio ativo de medicamentos ou de grupos de metabólitos secundários que são marcadores em espécies de plantas medicinais. A espectrofotometria se baseia em um processo de medida que emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorverem e/ou emitirem energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético (LOBINSKI; MARCZENKO, 1992; ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Neste trabalho, o método espectrofotométrico baseou-se na reação colorimétrica de Bornträeger, onde as agliconas e as antraquinonas glicosiladas comportam-se de diferentes maneiras. Apenas os compostos que não possuem açúcar são detectadas por este reagente, sendo necessária uma hidrólise preliminar dos heterosídeos antraquinônicos para um doseamento eficiente buscando a finalidade pretendida, principalmente pelo fato de polifenóis existirem predominantemente como glicosídeos na natureza (CHIANG et al., 2012).

Nesta reação, as substâncias 1,8-hidroxi-antraquinônicas exercem efeito mesomérico acentuado, em virtude dos grupos carbonílicos. Este estado de mesomeria é alcançado pela formação de uma ponte de hidrogênio, resultando em um sistema de quatro anéis. Em solução, as moléculas absorvem luz em aproximadamente 430nm, possuindo uma cor amarelo-alaranjada. Para a quantificação dos derivados hidroxi-antraquinônicos na reação de Bornträeger é necessário que o meio esteja alcalino para que ocorra a ionização das hidroxilas fenólicas. Esta ionização produz uma maior

ressonância molecular, fazendo com que os máximos de absorção desloquem-se nos sentidos de maiores comprimentos de ondas (cerca de 520 nm) (Figura 3) e as soluções alcalinas coram-se de vermelho, cor característica observada na reação de Bornträger (COSTA, 1994; SOUSA et al., 2003).

Figura 3 - Deslocamento do comprimento de onda em virtude da ionização das hidroxilas das antraquinonas na reação de Bornträger.



Fonte: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/antraquinonas.html>.

Dentre os métodos utilizados para o doseamento dos derivados hidroxiantracênicos por espectrofotometria, está o método farmacopeico. No entanto, tal metodologia requer um grande tempo de preparação, estando classificada como um método analítico bastante demorado, pois a preparação da amostra consiste em diversas etapas e na utilização de solventes tóxicos e reagentes e equipamentos que podem ser de difícil obtenção em alguns laboratórios de análise. O desenvolvimento de metodologias menos onerosas, mais facilmente executáveis e que normalmente empregam menor aparato instrumental são de grande valia e requerem a realização de estudos de validação destas técnicas para cada espécie e órgão vegetal específico a fim de garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (PELOZO; CARDOSO; MELLO, 2008; SILVA-CORAZZA et al., 2010). Nesse sentido, a fim de desenvolver um novo método para a determinação do teor de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *S. angustifolia* e do seu controle de qualidade, um método de doseamento através da Espectrofotometria na região do Visível foi desenvolvido e validado, daí a importância do desenvolvimento de uma técnica analítica rápida e simples para

quantificar o ingrediente ativo, com a intenção de contribuir para o desenvolvimento de novas drogas.

3.6.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Entre os diferentes tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais amplamente utilizada como uma ferramenta essencial para a análise de pesquisa, devido à sua aplicabilidade universal e notável precisão do ensaio (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Diversas publicações científicas têm enfatizado a utilização de detectores ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodos (DAD), no caso de compostos que absorvem radiação UV (TISTAERT; DEJAEGER; HEYDEN, 2011). Esta técnica é adequada para a rápida identificação e quantificação de constituintes de misturas complexas tais como em extratos de plantas (WYREPKOWSKI et al., 2014).

Além desta técnica ser de ampla utilização para a quantificação de metabólitos presentes em extratos vegetais, a escassez de um método de quantificação simultânea dos senosídeos A e B nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) levanta a necessidade de desenvolvimento de um método rápido, prático e reprodutível que identifique e quantifique esses metabólicos simultaneamente, ampliando, assim, as alternativas por parte das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos produtos.

3.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A aceitação pela comunidade científica de drogas vegetais e produtos derivados baseia-se na adoção de marcadores para a proposição de especificações da qualidade, recorrendo-se ao emprego de métodos analíticos capazes de quantificar um ou alguns dos diversos compostos, ou métodos gerais de doseamento de grupos. O desenvolvimento ou a adaptação de um método analítico implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como sua eficiência na rotina laboratorial. Esta confiabilidade e capacidade, que está sendo cada vez mais exigida pelos órgãos sanitários é confirmada por um procedimento denominado validação (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Para a garantia da qualidade dos produtos de origem vegetal a Instrução Normativa (IN 4, 2014) define que é fundamental a validação da metodologia analítica, pois esta fornece informações confiáveis e interpretáveis do método em análise. A validação começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento e transferência de um método. Para registro de novos produtos, o órgão regulador do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), exige a validação das metodologias analíticas e estabelece documentos oficiais que direcionam os critérios a serem adotados nesse processo (RIBANI et al., 2004)

A Resolução Específica (RE) nº 899/03 da ANVISA especifica que a validação deve ser realizada através da análise de uma série de parâmetros que têm como principal objetivo atestar a eficiência dos métodos na rotina laboratorial (BRASIL, 2003). São eles:

- Especificidade → A especificidade é um importante parâmetro, principalmente na análise de matrizes complexas em plantas medicinais, onde a interferência dos vários metabólitos presentes nos extratos representa a principal dificuldade no desenvolvimento de procedimentos confiáveis, em virtude da sobreposição das bandas dos metabólicos que absorvem radiação no mesmo comprimento de onda no método espectrofotométrico ou da incerteza do tempo de retenção do composto de interesse no método cromatográfico (ARAÚJO et al., 2013).
- Seletividade → A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). No caso de matrizes complexas tal como drogas vegetais, a indisponibilidade da matriz sem o analito, não permite que sua interferência possa ser quantificada. Portanto, alternativamente, a seletividade pode ser investigada através da comparação das curvas obtidas para a amostra e para a curva do adicionado a matriz. Desta forma, a comparação e comprovação do paralelismo das duas curvas, permite inferir acerca da seletividade do procedimento a partir da interferência da matriz na resposta do método àquele padrão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

- Linearidade → É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. O coeficiente de determinação é calculado pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados. Os dados obtidos devem ter o coeficiente de determinação $> 0,99$, indicando que 99% das variabilidades experimentais são explicadas pelos modelos matemáticos encontrados. Comprovando, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respostas analíticas, atendendo os requisitos preconizados para análise desse parâmetro ($> 99\%$) (BRASIL, 2003).
- Limite de Detecção e Quantificação → O Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já 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. Os baixos limites de Detecção e Quantificação indicam que o método não sofre interferência importante da técnica instrumental (BRASIL, 2003).
- Precisão
 - Repetibilidade (intracorrída) → A repetibilidade expressa a fidelidade dos resultados obtidos nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto intervalo de tempo (BRASIL, 2003).
 - Precisão intermediária (intercorrída) → Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).
- Exatidão → A exatidão de um método expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência (BRASIL, 2003).

- Robustez → A robustez pode ser definida como a sensibilidade de um método frente a pequenas variações nas condições analíticas. Estas pequenas mudanças refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (BRASIL, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados os frutos secos de *Senna angustifolia* Vahl, fornecidos pela empresa Santos Flora Comercio de Ervas Ltda, São Paulo-SP, Brasil, lote: SENF01/0411, originários da Índia, colhidos em abril de 2011. O material vegetal foi triturado em moinho de facas (1 mm). Em seguida, foi armazenado em recipiente de vidro bem fechado e ao abrigo da luz até o momento da sua utilização.

4.2 REAGENTES E SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Todos os solventes utilizados eram de grau analítico: acetonitrila (Cinética®), ácido triflouracético (Vetec®), ácido clorídrico (Vetec®), água ultrapura (MilliQ®), álcool etílico (Cinética®), bicarbonato de sódio (Nuclear®), clorofórmio (Vetec®), hidróxido de amônio (Vetec®). Os senosídeos A e B, adquiridos da Farmacopeia Americana (lote: 10G087, U.S.P.), foram utilizados como padrão.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS DE *Senna angustifolia* VAHL.

4.3.1 Análise granulométrica por tamisação

Amostras de 25 g, exatamente pesadas, da matéria-prima vegetal cominuída foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 600, 425, 250, 150 e 90 µm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. Para a análise dos dados, as frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e a média entre as amostras foi calculada utilizando a equação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$\text{Fração retida (\%)} = \frac{P_1}{P_2 \cdot 100} \quad (1)$$

*P*1: peso do material retido em cada tamis (g); *P*2: somatório dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (g); 100: fator de porcentagem.

4.3.2 Determinação da perda por dessecação

Amostras contendo 2,0 g do pó dos frutos foram transferidas para pesa-filtros previamente dessecados durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. As amostras foram colocadas na estufa, com temperatura igual a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas, seguidas de resfriamento em dessecador por 30 minutos e pesagem em balança analítica (Shimadzu®). A operação foi repetida em ciclos de uma hora até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações, segundo a equação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100 \quad (2)$$

Onde: P_u : peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g); P_s : peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g); P_a : peso da amostra (g); 100: fator de porcentagem.

4.3.3 Determinação de cinzas totais

Amostras contendo 3,0 g do material vegetal foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla por 3 horas, sob gradiente crescente de temperatura (30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a $600 \pm 25^\circ\text{C}$). Em seguida foram arrefecidos por 30 minutos em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos pela média de três determinações, segundo a equação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \frac{C_{di} - C}{Pa} \times 100 \quad (3)$$

C_{di} : peso do cadinho contendo a amostra após incineração (g); C : peso do cadinho sem a amostra (g); P_a : Peso da amostra (g); 100: fator de porcentagem.

4.3.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Para a determinação de cinzas insolúveis em ácido, o resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido em chapa aquecedora, com 25,0 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v), durante 5 minutos, no cadinho original coberto com vidro de relógio. Após fervura, o vidro de relógio foi lavado com 5,0 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Em seguida, o líquido foi filtrado em papel de filtro e o resíduo lavado com água quente. O papel de filtro contendo o resíduo foi então colocado no mesmo cadinho, seco na chapa aquecedora e incinerado a 500 °C. A cada 30 minutos, os cadinhos eram retirados da mufla, dessecados durante 30 minutos e pesados, repetindo-se o procedimento até peso constante. Foi calculada a média das três amostras e a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido à droga seca ao ar pela expressão (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$\text{Cinzas insolúveis em ácido (\%)} = \frac{C_{ai} - C_{di}}{P_a} \times 100 \quad (4)$$

C_{ai} : peso do cadinho contendo as cinzas (g); C_{di} : peso do cadinho contendo as cinzas após incineração (g); P_a : Peso da amostra (g); 100: fator de porcentagem.

4.4 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS HIDROXIANTRACÊNICOS TOTAIS

4.4.1 Avaliação de métodos farmacopeicos

O desempenho das metodologias descritas na Farmacopeia Britânica e na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2012) para a quantificação dos derivados antracênicos nos frutos de *S. angustifolia* foi avaliada através da resposta analítica e do acompanhamento através de CCD de cada fração resultante dos passos analíticos.

4.4.1.1 Preparação das amostras farmacopeicas

A determinação do teor de derivados hidroxiantracênicos pelos métodos presentes nas Farmacopeias Brasileira e Britânica (FARMACOPEIA BRASILEIRA,

2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2012) foi realizada em triplicata, através de uma extração aquosa da droga vegetal. Após, foi realizada a hidrólise com ácido clorídrico 2 M e a extração com solvente orgânico. A fase orgânica foi rejeitada. A fase aquosa foi centrifugada e levada à hidrólise ácida. Após resfriamento, a solução foi extraída com éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos em balão de 25 mL e o volume completado com éter etílico. A solução amostra foi preparada evaporando-se parte da solução etérea, em banho-maria, até resíduo, que foi então ressuspensionado com acetato de magnésio. Imediatamente após o seu preparo, a absorvância da solução amostra foi medida em espectrofotômetro, em 515 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. O teor de derivados hidroxiantracênicos foi calculado como senosídeo B, utilizando 240 como valor de absorvância específica.

4.4.1.2 Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD)

Placas cromatográficas foram preparadas para avaliação e comparação da fração orgânica e da fração aquosa após extração dos derivados hidroxiantracênicos. Os parâmetros para o desenvolvimento da placa cromatográfica foi estabelecido conforme descrito na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o teste de identificação dos derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *S. angustifolia* em (CCD).

Classe de metabólito	Sistema de eluição	Revelador	Referência
Derivados hidroxiantracênicos	AcOEt:n-propanol:H ₂ O: CH ₃ COOH (40:40:30:1)	HNO ₃ /KOH	Farmacopeia Brasileira 5ª Edição

4.4.2 Quantificação de antraquinonas pelo método de Bornträeger

4.4.2.1 Preparação da amostra para o método Bornträeger

A amostra foi obtida sob refluxo com solução hidroalcoólica a 70% (v/v). A extração foi realizada em balão de fundo redondo, no qual 1,0 g dos frutos de *S. angustifolia* foram levados à extração com 30 mL de solução hidroalcoólica durante 30 minutos. O extrato foi resfriado à temperatura ambiente (25 °C) e filtrado em algodão, sendo o resíduo (algodão e material vegetal) re-extraído, por duas vezes, durante 15 minutos com mais 30 mL de solução hidroalcoólica em cada vez. As frações filtradas foram reunidas em balão volumétrico e o volume ajustado para 100 mL com mesmo solvente, originando a solução estoque (SE).

4.4.2.1.1 Obtenção de fração enriquecida em antraquinonas

A uma alíquota de 30 mL de SE foi adicionada de 1,0 mL de ácido clorídrico (2M) e esta solução foi levada à manta aquecedora sob refluxo por 15 minutos. A solução resultante foi transferida para funil de separação onde realizou-se partição com clorofórmio (3 x 15 mL). As fases clorofórmicas foram reunidas e a solução resultante foi lavada com 50 mL de água destilada. A fração orgânica foi separada, transferida para balão de 50 mL e o volume completado com o mesmo solvente. Esta solução foi levada à secura em cápsula de porcelana no banho-maria. Em seguida o resíduo foi retomado com etanol para balão de 25 mL. A cápsula de porcelana foi lavada várias vezes, transferindo quantitativamente o resíduo obtido. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 2,0 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) P.A. O volume foi completado com solução hidroalcoólica (70%, v/v) e as absorvâncias das amostras foram mensuradas em espectrofotômetro UV/Vis (ThermoScientific®) (300 a 600 nm), após 40 minutos da adição da base, tomando como branco a mesma solução amostra sem a adição da solução de NH₄OH.

4.4.2.2 Solução dos padrões

Foram pesados 12,5 mg da mistura de senosídeos A e B, transferidos para balão volumétrico de 2 mL e o volume completado com etanol 70%. Após solubilização em sonificador por cerca de 10 minutos, esta solução foi transferida para balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, onde foi adicionado 1 mL de HCl 2M. O balão foi levado ao aquecimento em manta aquecedora por 15 minutos sob refluxo. A

solução resultante foi transferida quantitativamente para balão de 5 mL e o volume completado com etanol 70% (v/v). Alíquotas desta solução (50 a 150 μ L) foram transferidas para balões com capacidade de 5 mL, onde foi acrescentado 1 mL de NH_4OH e o volume completado com etanol 70% (v/v). A absorvância foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 515 \text{ nm}$) após 45 minutos da adição da base.

4.4.2.3 Determinação da concentração da amostra e do comprimento de onda

Diversas diluições (1,2 mg/mL a 8,4 mg/mL) de amostras obtidas conforme descrito anteriormente foram submetidas a varreduras na faixa de 300 a 600 nm em espectrofotômetro. Os espectros obtidos foram utilizados para estabelecimento da faixa de diluição e do comprimento de onda mais apropriados para a avaliação do método.

4.4.2.4 Avaliação do líquido extrator

Foram testados metanol 50 e 100%, etanol 50, 70 e 90% e água para a escolha do solvente e da diluição que mostrasse um maior rendimento de extração para a finalidade proposta.

4.4.2.5 Avaliação da concentração do ácido sobre a performance do método

Foram avaliadas alíquotas (0,5, 1,0 e 1,5 mL) de ácido clorídrico (HCl 2M) ideal para a hidrólise completa dos heterosídeos antraquinônicos, tendo em vista que na reação de Bornträeger apenas são quantificados os compostos aglicônicos.

4.4.2.6 Avaliação da concentração de NH_4OH

A eficiência da reação colorimétrica com os derivados hidroxiantracênicos presentes na droga vegetal foi investigada empregando diferentes concentrações de NH_4OH : 50, 75 e 100% (v/v).

4.4.2.7 Avaliação da alíquota de NH_4OH

Após a avaliação da alíquota da amostra e da concentração de NH_4OH , foram realizados testes variando a alíquota da base (1, 2 e 3 mL) para verificar qual apresentava o valor mais adequado de absorvância para o método proposto.

4.4.2.8 Determinação do tempo de leitura

Foi realizada utilizando-se a quantidade inicial de droga determinada (1,25 g) e após fixação dos parâmetros de otimização descritos anteriormente. A cinética de reação das amostras foi acompanhada a cada 5 minutos após a adição de 2 mL de NH_4OH 100%, durante 120 minutos.

4.4.2.9 Avaliação da proporção droga:solvente

Para a avaliação da proporção droga:solvente foram obtidas soluções amostras variando-se apenas a quantidade de material vegetal (0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 g). Este parâmetro foi avaliado através da relação entre concentração das cinco soluções obtidas e o respectivo teor de derivados hidroxiantracênicos (DH). Esse teor, expresso em senosídeo B, foi calculado pela seguinte equação:

$$DH = \frac{A \times 2,27}{m} \quad (5)$$

Onde: A = absorvância lida; m = massa da droga (considerando a perda por dessecação).

4.4.3 Validação do método espectrofotométrico

4.4.3.1 Especificidade

A especificidade do método espectrofotométrico foi demonstrada pela sobreposição dos espectros do padrão e da solução amostra de Sene, obtidos após reação com hidróxido de amônio, na faixa de 300 a 600 nm.

4.4.3.2 Seletividade

A seletividade foi estabelecida através da avaliação do paralelismo da reta obtida no teste da seletividade e da reta da curva de calibração da amostra, através da média dos seus coeficientes angulares. A igualdade dos parâmetros da regressão foi avaliada pelo teste *t student* para averiguar se essas médias podem ser consideradas iguais estatisticamente em um nível de 95% de confiança. Para este teste, as respectivas concentrações da curva de calibração da amostra (1,2 a 8,4 mg/mL) foram contaminadas com uma quantidade fixa (50 µL) de uma solução dos senosídeos A e B de concentração também conhecida (25 µg/mL). Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), sendo $R^2 > 0.99$, o mínimo aceitável.

4.4.3.3 Linearidade

Curva analítica para a amostra: A curva de linearidade do método espectrofotométrico para a amostra foi construída utilizando concentrações na faixa de 1,2 a 8,4 mg/mL da solução amostra. As absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm após 45 minutos da adição da base.

Curva analítica para o padrão: A curva de linearidade no método espectrofotométrico para o padrão foi construída utilizando as concentrações de 25 a 75 µg/mL da solução padrão. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro após 45 minutos da adição da base.

As curvas foram construídas utilizando-se a média de três curvas de calibração e plotando-se os valores médios das áreas em função da concentração. Os resultados para as curvas da amostra e dos padrões foram avaliados estatisticamente através do teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com o auxílio do Microsoft Excel (2010).

4.4.3.4 Limite de detecção e quantificação

Foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média do padrão para efetuar os cálculos dos limites de detecção e quantificação. As equações abaixo foram utilizadas para a determinação dos limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos, conforme preconizadas pelo International Conference on Harmonization (ICH, 2005) e pela RE nº899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

$$LD = 3 \cdot \left(\frac{DPa}{IC} \right) \quad (6)$$

$$LQ = 10 \cdot \left(\frac{DPa}{IC} \right) \quad (7)$$

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.

4.4.3.5 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intracorrida), na qual foram examinadas, em um único dia pelo mesmo analista, seis determinações individuais para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de soluções amostras diferentes; e, pela precisão intermediária (precisão intercorrida), a qual foi determinada em triplicata, por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%. Os teores espectrofotométricos para os derivados hidroxiantracênicos, calculados como equivalentes de senosídeo B, foram expressos em g%, considerando a perda por dessecação em todos os cálculos.

4.4.3.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas do padrão (senosídeo) a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas correspondentes. Para o método espectrofotométrico, soluções amostras a 2,4 mg/mL foram contaminadas com alíquotas de soluções de senosídeo de concentração conhecida (37,5; 50,0 e 62,5 µg/mL). Foram obtidas três

soluções com três réplicas cada e os resultados foram expressos utilizando a média e o Desvio Padrão Relativo (DPR %).

4.4.3.7 Robustez

Os ensaios para a determinação da robustez foram realizados através de pequenas alterações no método. As mudanças realizadas no método espectrofotométrico foram: evaporação da fração orgânica (chapa aquecedora ou banho-maria), alteração do fabricante do clorofórmio e mudança do comprimento de onda para leitura (513 e 517 nm). Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através das alterações no teor dos senosídeos.

4.5 MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SENOSÍDEOS A E B

4.5.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido HPLC (Modelo Ultimate 3000, ThermoScientific®) equipado com Detector de Arranjo de Diodos (DAD) a 280 nm, desgaseificador e sistema de injetor automático. O sistema foi controlado pelo programa Chromeleon, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento dos dados referentes às amostras. Foi utilizada uma coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Macherey-Nagel®, C₁₈; 5 µm), protegida por pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (C₁₈, 3,9 µm). A análise foi realizada em temperatura ambiente (23 °C ± 1 °C), controlada por ar condicionado. A fase móvel A utilizada foi constituída por mistura de água e ácido trifluoracético (100:0,08) e a fase móvel B por acetonitrila. Ambas as fases foram desgaseificadas e filtradas através de um filtro de tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore). Utilizou-se o fluxo de 0,9 mL/min da fase móvel, em modo gradiente, por 45 minutos.

Fase móvel

Eluente A: mistura de água e ácido trifluoracético (100:0,08)

Eluente B: acetonitrila

Gradiente da Fase móvel: adotou-se o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

Tabela 2 - Gradiente utilizado para análise de senosídeos nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl.

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0 – 12	86	14	Isocrática
12 – 19	86 → 77	14 → 23	Gradiente linear
19 – 28	77 → 70	23 → 30	Gradiente linear
28 – 31	70 → 0	30 → 100	Gradiente linear
31 – 45	0	100	Isocrática

Calculou-se o teor de senosídeo B e senosídeo A na amostra a partir da equação a seguir:

$$SB/SA = \frac{AA \times FDA \times MP}{Ap \times MA \times FDP} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

SB/SA = Senosídeo B/Senosídeo A;

AA = Absorvância da *Solução amostra*;

Ap = Absorvância do padrão;

MA = massa da amostra considerando a determinação de água;

MP = massa do padrão considerando a pureza;

FDA = fator de diluição da amostra;

FDP = fator de diluição do padrão.

O resultado foi expresso pela média das determinações em gramas de senosídeo B e senosídeo A por 100 gramas da droga (%), considerando o teor de água em todos os cálculos.

4.5.2 Solução amostra

Pesou-se 0,2 g da droga seca e moída e colocou-se em tubo de centrifuga. Adicionou-se 5 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,05% (p/v) e levou-se ao banho de ultrassom durante 10 minutos. Esta solução foi centrifugada por 20 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi transferido, filtrando-o com algodão, para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com bicarbonato de sódio (40 mg/mL). O sobrenadante foi filtrado através de membrana. Após, diluiu-se 50 µL da solução resultante em 150 µL de água.

4.5.3 Solução padrão

Dissolveu-se 2 mg da mistura de senosídeo A SQR e senosídeo B SQR em balão de 5 mL com metanol 50%. Agitou-se vigorosamente até total solubilização. Diluiu-se uma alíquota de 0,5 mL desta solução para 1 mL com metanol 50% (200 µg/mL) para o cálculo do teor do senosídeo B e 0,4 mL para 1 mL com o mesmo solvente para o cálculo do senosídeo A.

4.5.4 Validação do método por CLAE

4.5.4.1 Especificidade

A especificidade do método cromatográfico foi demonstrada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de Ultravioleta da amostra e do padrão, onde foi realizada a varredura de 190 nm a 400 nm do padrão senosídeos B e A e da amostra de Sene. Estes parâmetros foram empregados para confirmar a identidade do composto de interesse e o padrão utilizado para a metodologia foi a mistura composta pelos senosídeos A e B (98%, U.S.P.).

4.5.4.2 Linearidade

Curva analítica para a amostra: A linearidade da amostra no método cromatográfico entre a área do pico e a concentração foi analisada utilizando-se cinco diferentes concentrações na faixa de 1,3 a 13,9 mg/mL.

Curva analítica para o padrão: A linearidade dos padrões no método cromatográfico entre a área do pico e a concentração foi analisada com soluções padrão de senosídeos em cinco concentrações diferentes, sendo na faixa de 45,6 a 83,6 µg/mL para o senosídeo A e de 99,2 a 148,8 µg/mL para o senosídeo B.

As curvas foram construídas utilizando-se a média de três curvas de calibração e plotando-se os valores médios das áreas em função da concentração. Os resultados para as curvas da amostra e dos padrões foram avaliados estatisticamente através do teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com o auxílio do Microsoft Excel (2010).

4.5.4.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média dos senosídeos para efetuar os cálculos dos limites de detecção e quantificação. As equações abaixo foram utilizadas para a determinação dos limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos, conforme preconizadas pelo ICH (2005) e pela ANVISA (BRASIL, 2003).

$$LD = 3 \cdot \left(\frac{DPa}{IC} \right) \quad (8)$$

$$LQ = 10 \cdot \left(\frac{DPa}{IC} \right) \quad (9)$$

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.

4.5.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intracorrída), na qual foram examinadas, em um único dia pelo mesmo analista, seis determinações individuais para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de soluções amostras diferentes; e, pela precisão intermediária (precisão intercorrída), a qual foi determinada em triplicata, por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%. Os teores dos senosídeos A e B pelo foram expressos em g%, considerando a perda por dessecação em todos os cálculos.

4.5.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas do padrão (senosídeos A e B) a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas correspondentes. Para o método cromatográfico, nas soluções amostras a 10 mg/mL foram adicionadas alíquotas de 1 mL de soluções de senosídeos A e B em três níveis crescentes de concentrações a 80, 100 e 120%. Foram obtidas três soluções com três réplicas cada e os resultados foram expressos utilizando a média e o DPR (%).

4.5.4.6 Robustez

Os ensaios para a determinação da robustez foram realizados através de pequenas alterações no método. Para o método cromatográfico foram utilizadas como variáveis os seguintes parâmetros: mudança de fluxo em nível baixo (0,80 mL/min) e alto (1,0 mL/min); mudança no pH da fase móvel A em nível baixo (pH 1,7) e alto (pH 1,9) e; mudança na temperatura do forno (de 22 °C para 25 °C). Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através das alterações no teor dos senosídeos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 Análise granulométrica

Os resultados observados através do histograma representativo para distribuição granulométrica do pó dos frutos de *Senna angustifolia* Vahl demonstram que as partículas do material encontram-se predominantemente distribuídas entre os tamises de 250 e 150 μm representando 50,3% de todo o material (Figura 4). Já o tamanho médio das partículas determinado pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem, apresentou valor de 302,1 μm (Figura 5). De acordo com esses dados, o pó dos frutos de *S. angustifolia* foi classificado como moderadamente grosso (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 4 - Histograma de distribuição granulométrica dos frutos de *Senna angustifolia*.

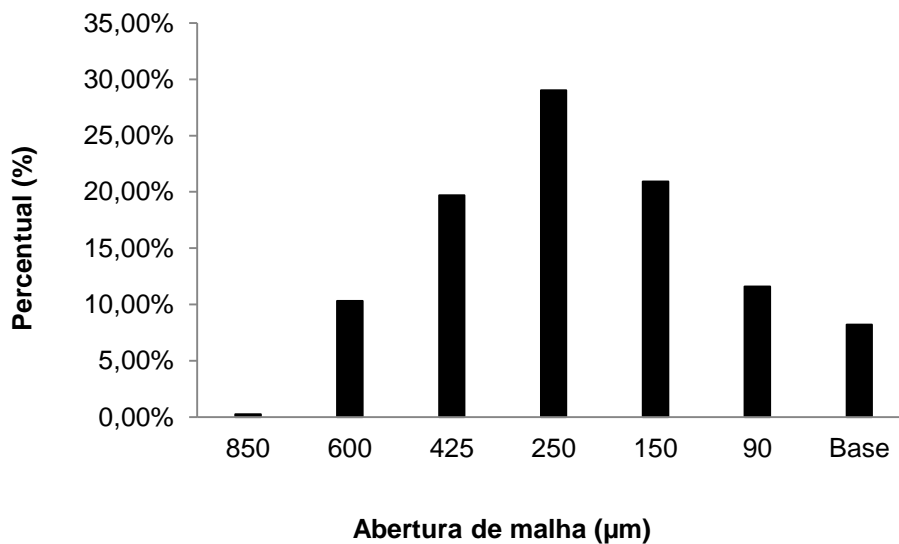
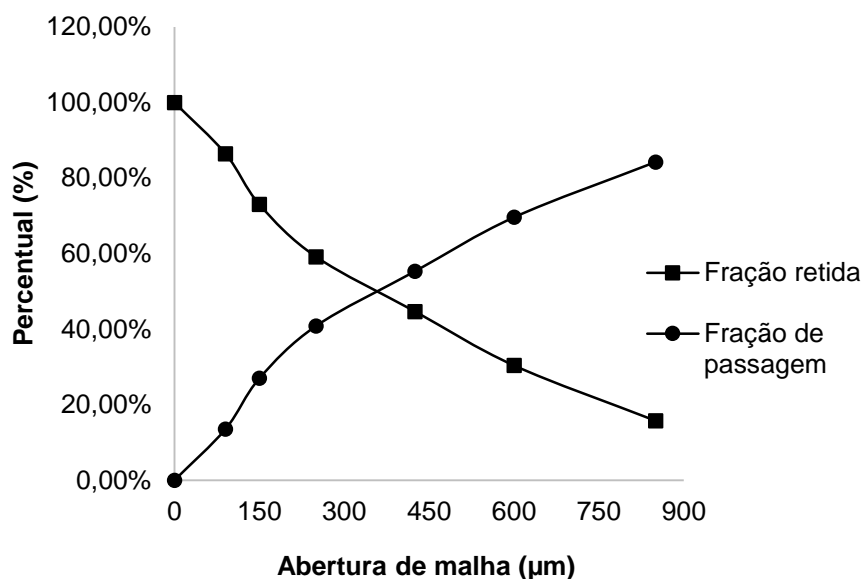


Figura 5 - Curva de retenção e passagem dos frutos de *Senna angustifolia*.



5.1.2 Perda por dessecação

A perda por dessecação é um teste farmacopeico que se destina a determinar o percentual de umidade residual da droga vegetal e corresponde a um índice de qualidade e garantia de sua conservação, tendo em vista que teores de umidade acima do especificado podem favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias, além de hidrólise e atividade enzimática com consequente deterioração de constituintes químicos (COUTO et al., 2009). A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza um limite de aceitação de 8 a 14% de teor de umidade para drogas vegetais. As amostras cumpriram o ensaio e a média de teor de água em *S. angustifolia* obtida foi de $12,74\% \pm 0,0496$ (0,39%), permitindo inferir que a droga possui as condições apropriadas para manutenção da estabilidade microbiológica e química.

5.1.3 Cinzas totais e insolúveis em ácido

O teor de cinzas totais revela a quantidade de material inorgânico tanto intrínseco no material vegetal (cinzas intrínsecas) quanto a quantidade de substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (BRAGA et al., 2007). Já o teor de cinzas insolúveis em ácido, que constitui o resíduo obtido na fervura de cinzas totais com ácido clorídrico diluído, destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os resultados obtidos para

os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido encontram-se descritos na tabela 3. Os dados demonstram que ambos os parâmetros se encontram dentro dos limites preconizados (< 9%).

Tabela 3 -Teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido para a amostra de *S. angustifolia*.

Ensaio	Média \pm DP (DPR%)
Teor de Cinzas totais (%)	7,33% \pm 0,093 (1,27%)
Teor de Cinzas insolúveis em ácido (%)	0,87% \pm 0,026 (2,96%)

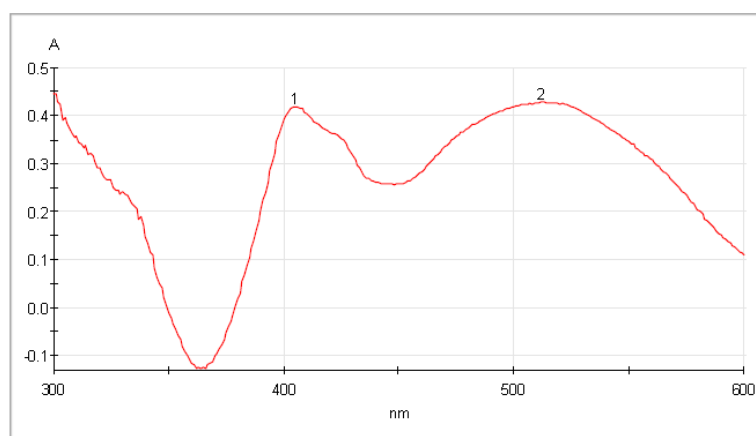
DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

5.2.1 Obtenção da alíquota da amostra e comprimento de onda

O comprimento de onda observado no espectro de absorção da amostra (Figura 6), após a reação com NH_4OH , apresentou máximo em 515 nm. Considerando as diluições das soluções amostras testadas, a que apresentou valor de absorvância mais adequado para o método foi a de 3:10 v/v ($A = 0,421$), correspondendo a concentração de 3,6 mg/mL.

Figura 6- Espectro de varredura da amostra de *Senna angustifolia* na faixa de 300 e 600 nm.



5.2.2 Avaliação do líquido extrator

Tendo em vista a diferença de polaridade dos compostos das diversas classes de metabólitos presentes nas espécies vegetais e a presença ou não de açúcares em sua composição, se faz necessário a realização de ensaios que determinem a escolha do solvente ideal para um maior rendimento do processo extrativo. Foram testados vários solventes e suas diluições para a escolha daquele que apresentasse o melhor rendimento extrativo de derivados hidroxiantracênicos. A tabela 4 sumariza os resultados em rendimento de derivados hidroxiantracênicos (g%) para os ensaios realizados com cada uma das amostras preparadas com os diferentes solventes extratores. Os dados demonstram que o emprego de etanol 70% (v/v) proporcionou maior rendimento. A análise estatística dos dados através do teste t de *Student* revelou que há diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre o rendimento obtido com etanol 70% e as demais condições extrativas.

Tabela 4 - Avaliação do melhor solvente para a extração dos derivados hidroxiantracênicos em *S. angustifolia*.

Solvente	Teor médio (g%) média \pm DP (DPR)	<i>t</i> calculado (etanol 70% / outros solventes)
Água	0,317 \pm 0,0120 (3,70)	83,88
Etanol 50%	0,722 \pm 0,0040 (0,55)	57,89
Etanol 70%	1,055 \pm 0,0091 (0,87)	
Etanol 90%	0,787 \pm 0,0123 (1,56)	30,30
Metanol 50%	0,499 \pm 0,0060 (1,20)	88,19
Metanol 100%	0,554 \pm 0,0026 (0,47)	91,39

DP = desvio padrão; DPR% = desvio padrão relativo. *t* tabelado = 2,77

5.2.3 Avaliação da concentração do ácido sobre o desempenho do método

A proposta da hidrólise dos heterosídeos se faz ainda mais importante no método desenvolvido, pois na reação de Bornträeger só é possível a quantificação das agliconas, sendo necessária uma hidrólise preliminar dos açúcares presentes nos heterosídeos para um doseamento eficiente dos derivados hidroxiantracênicos totais presentes na droga vegetal. Este fato torna-se importante principalmente porque a grande maioria dos polifenóis como flavonoides, antraquinonas, lignanas, e ácidos aromáticos existem predominantemente como glicosídeos (CHIANG et al., 2012). Na tabela 5 é possível observar que a alíquota de 1 mL mostrou o melhor resultado para o método, pois uma quantidade maior ou menor de ácido diminui a eficiência do mesmo e isto pode ser comprovado pelo teste *t Student* entre a alíquota de 1 mL e as demais (0,5 e 1,5 mL), evidenciando a diferença estatística entre as médias em virtude do *t calculado* permanecer superior ao *t tabelado*.

Tabela 5 -Avaliação da influência do HCl 2M para hidrólise dos heterosídeos hidroxiantracênicos.

Alíquota HCl 2M (mL)	Teor médio (g%)	<i>t calculado</i>
	média ± DP (DPR)	(1,0 mL HCl 2M / Alíquota HCl 2M)
0,5	0,883 ± 0,0183 (2,07)	18,09
1,0	1,096 ± 0,0091 (0,83)	
1,5	0,951 ± 0,0105 (1,11)	18,01

DP = desvio padrão; DPR% = desvio padrão relativo.

t tabelado = 2,77

5.2.4 Avaliação da concentração de NH₄OH

A escolha do hidróxido de amônio (NH₄OH) como agente alcalinizante baseou-se em procedimentos anteriores descritos na literatura para quantificar antraquinonas totais (PEREZ; JIMENEZ; PULPEIRO, 2005; SAKULPANICH; GRITSANAPAN,

2009). Além disso, escolheu-se também a diluição ideal de hidróxido de amônio (NH_4OH) (v/v) para que a reação de Borntræger mostrasse um melhor rendimento do teor de derivados hidroxiantracênicos. Para a realização do teste deste parâmetro foram utilizadas três concentrações da base supracitada (50, 75 e 100%) e, como observado na tabela 6, a que mostrou melhor resposta foi a concentração de 100%, confirmada pela diferença estatística, com 95% de confiança, encontrada entre esta concentração e as demais através teste *t Student*.

Tabela 6 – Avaliação da concentração de NH_4OH como reagente para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos em *Senna angustifolia*.

Concentração de NH_4OH	Teor médio (g%)	<i>t calculado</i>
	média \pm DP (DPR)	(NH_4OH 100% / Outras concentrações)
50%	0,824 \pm 0,0108 (1,31)	41,69
75%	0,985 \pm 0,0030 (0,30)	44,55
100%	1,094 \pm 0,0030 (0,27)	

DP = desvio padrão; DPR% = desvio padrão relativo.

t tabelado = 2,77

5.2.5 Avaliação da alíquota de NH_4OH

Após a escolha da base (NH_4OH) e a seleção da concentração ideal da mesma (100%), realizou-se o teste da escolha da melhor alíquota de NH_4OH na qual a reação de Borntræger ocorresse de forma mais eficiente. Os resultados obtidos na tabela 7 evidenciam as médias dos teores obtidos nas três alíquotas testadas (1, 2 e 3 mL). De acordo com os resultados, as alíquotas de 2 mL e 3 mL foram as que mostraram melhor resposta e, para verificar se existe diferença significativa entre essas médias foi realizado um teste *t student* com nível de 95% de confiança mostrado na tabela 7. Como o *t calculado* entre essas duas alíquotas mostrou-se inferior ao *t tabelado*, pode-se inferir que não houve diferença significativa entre as médias dos teores das alíquotas de 2 mL e 3 mL de NH_4OH . Em virtude disto, escolheu-se a alíquota de 2

mL para o emprego do método levando em consideração o menor volume de solvente utilizado.

Tabela 7 - Avaliação das alíquotas de NH_4OH 100% como reagente para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos em *Senna angustifolia*.

Alíquotas de NH_4OH 100%	Teor médio (g%)	t calculado
	média \pm DP (DPR)	(2mL / 3mL)
1mL	0,951 \pm 0,0105 (1,11)	
2mL	1,144 \pm 0,0105 (0,92)	1,17
3mL	1,179 \pm 0,0143 (1,21)	

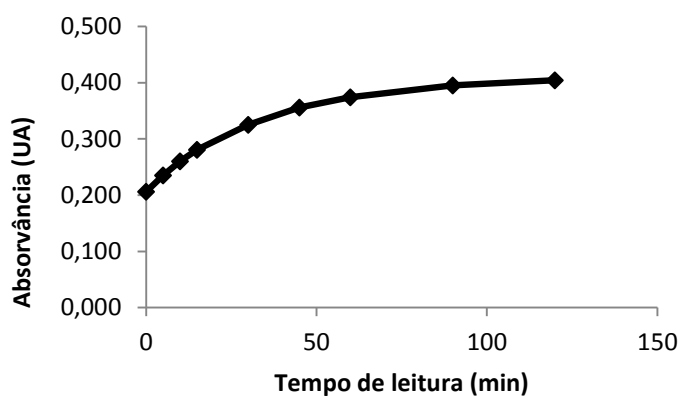
DP = desvio padrão; DPR% = desvio padrão relativo.

t tabelado = 2,77

5.2.6 Determinação do tempo de reação

A cinética da reação dos derivados hidroxiantracênicos em meio alcalino (NH_4OH 100%) mostrou-se lenta, com uma estabilização de reação em 45 minutos na absorvância, como mostra a figura 7. Com isso, estabeleceu-se o tempo de leitura de 45 min após a adição de NH_4OH 100%.

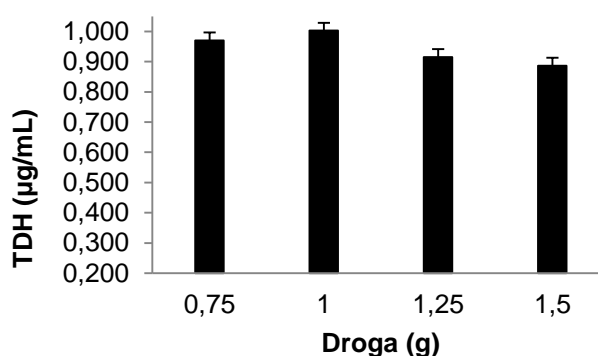
Figura 7 - Cinética de reação dos derivados hidroxiantracênicos com NH_4OH .



5.2.7 Avaliação da proporção droga:solvente

Através da avaliação da proporção droga:solvente na obtenção das soluções amostras, verificou-se que à medida que aumenta-se a quantidade de droga em um volume de solvente fixo, há saturação do solvente e diminuição da eficiência da extração. A quantidade de droga que mostrou o melhor resultado em teor de derivados hidroxiantracênicos foi de 1,0 g, como pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Avaliação da proporção de droga:solvente nos frutos de *Senna angustifolia*.



5.2.8 Avaliação do desenvolvimento do método espectrofotométrico

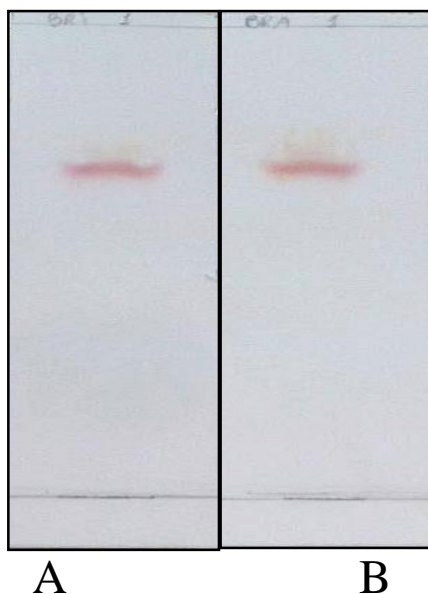
Os resultados obtidos, como observado na tabela 8, demonstram que os teores dos três métodos se assemelham, porém nas metodologias das Farmacopeias Britânica e Brasileira o teor se encontra um pouco abaixo do encontrado pela nova metodologia proposta. Essa diferença pode ser decorrente do descarte da fração orgânica após hidrólise dos heterosídeos nas metodologias presentes nos compêndios, ficando evidente a presença de derivados hidroxiantracênicos na fração a ser descartada, confirmada pela observação da coloração rósea, característica destes metabólitos, em placas de sílica-gel GF₂₅₄, através da cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 9).

Tabela 8 -Teores obtidos nos três métodos testados para o doseamento de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *S. angustifolia*.

	Método Bornträeger	Farmacopeia Brasileira	Farmacopeia Britânica
Leitura			
1	1,1428	1,07403	0,9932
Leitura			
2	1,1816	1,1039	1,0123
Leitura			
3	1,1868	1,0263	1,0219
Média	1,1704	1,0681	1,0091
DP	0,0240	0,0391	0,0146
DPR (%)	2,05	3,66	1,45

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Figura 9 - Avaliação da fração orgânica por cromatografia em camada delgada (CCD).

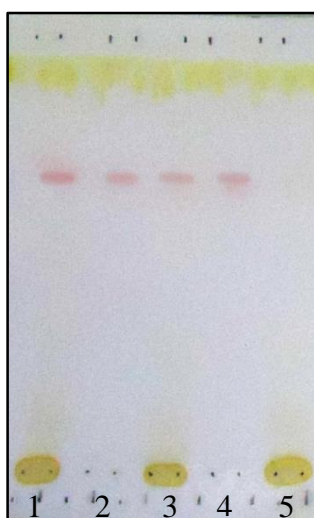


(A) Farmacopeia Britânica e (B) Farmacopeia Brasileira.

Outra possibilidade da diferença dos teores se encontra no líquido extrator das metodologias dos métodos farmacopeicos. Nestes métodos utiliza-se água como solvente, porém, conforme avaliado no método proposto o etanol 70% foi o que

apresentou melhor rendimento de extração para os compostos de interesse. Além disso, para a confirmação da eficiência da extração para a quantificação dos derivados hidroxiantracênicos em sua totalidade no método proposto, também foi realizado um teste de identificação em CCD, seguindo os mesmos parâmetros farmacopeicos citados anteriormente. Para isso, cinco frações da metodologia proposta foram testadas (Figura 10). A primeira (1) refere-se à solução amostra antes da partição, evidenciando a presença dos metabólitos de interesse. A segunda (2) e a terceira (3) bandas identificam as frações orgânica e a aquosa, respectivamente, após partição e sem adição do ácido clorídrico, evidenciando que ainda se fazem presentes os derivados hidroxiantracênicos em ambas as frações, inclusive na que irá ser descartada (aquosa), confirmando a necessidade de um tratamento prévio de hidrólise para um doseamento total destes compostos. As bandas quatro (4) e cinco (5) referem-se à fração orgânica e aquosa, respectivamente, após partição e com a adição do ácido clorídrico, concluindo que todos os heterosídeos foram hidrolisados e transferidos para a fração de maior afinidade (orgânica), a mesma que será utilizada posteriormente para quantificar estes metabólitos. Com isso, pode-se afirmar que o método apresenta resultados confiáveis para a quantificação total dos compostos hidroxiantracênicos.

Figura 10 - Avaliação da eficiência de extração dos derivados hidroxiantracênicos através da CCD.



LEGENDA:

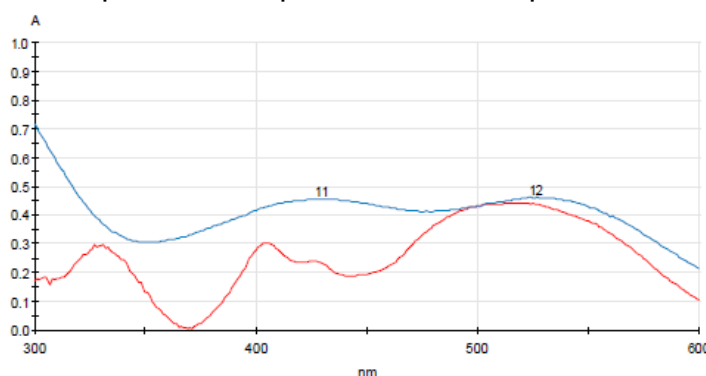
1. Solução amostra antes da partição;
2. Fração orgânica após a partição e sem adição do ácido clorídrico;
3. Fração aquosa após a partição e sem adição do ácido clorídrico;
4. Fração orgânica após a partição e com adição do ácido clorídrico;
5. Fração aquosa após a partição e com adição do ácido clorídrico;

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

5.3.1 Especificidade

Na metodologia proposta neste trabalho, este parâmetro foi demonstrado através da sobreposição dos espectros do padrão e da solução amostra para confirmar a identidade dos derivados hidroxiantracênicos presentes na amostra dos frutos de *S. angustifolia* após a adição de hidróxido de amônio. A Figura 11 apresenta os espectros sobrepostos do padrão (azul) e da solução amostra (vermelho), podendo-se observar o máximo de absorção característico de ambos no comprimento de onda de 515 nm, confirmando que o método é capaz de medir exatamente os compostos de interesse (derivados hidroxiantracênicos) (BRASIL, 2003).

Figura 11 - Ensaio de especificidade para o método espectrofotométrico.



5.3.2 Seletividade

A figura 12 apresenta as curvas obtidas para a solução amostra do Sene e para a solução da amostra enriquecida com o padrão (curva de seletividade). Os parâmetros de regressão foram avaliados e a linearidade das curvas comprovada pelos coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$). Para avaliar a seletividade, foram comparados estatisticamente os coeficientes angulares das duas curvas (tabela 9), e o resultado revelou não haver diferença significativa entre a resposta do método à solução amostra ou a solução contaminada com o padrão. Desta forma, pode-se assegurar que a resposta da técnica é majoritariamente decorrente do analito e, portanto, o método poder ser considerado seletivo para derivados hidroxiantracênicos.

Figura 12 -Seletividade para o método espectrofotométrico.

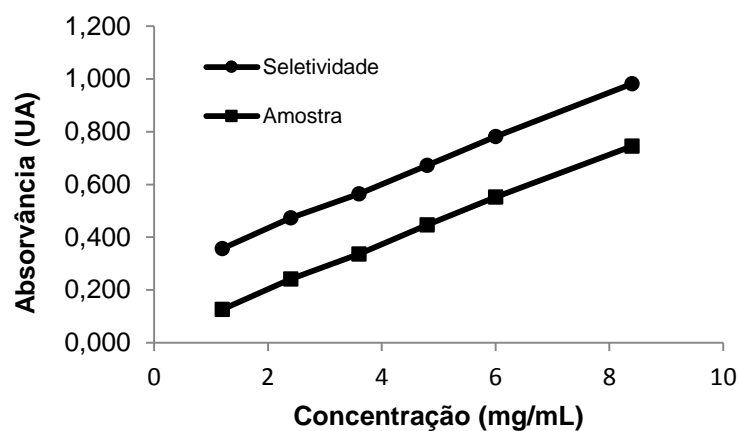


Tabela 9 - Análise estatística para os coeficientes angulares (α) das curvas obtidas no ensaio da seletividade.

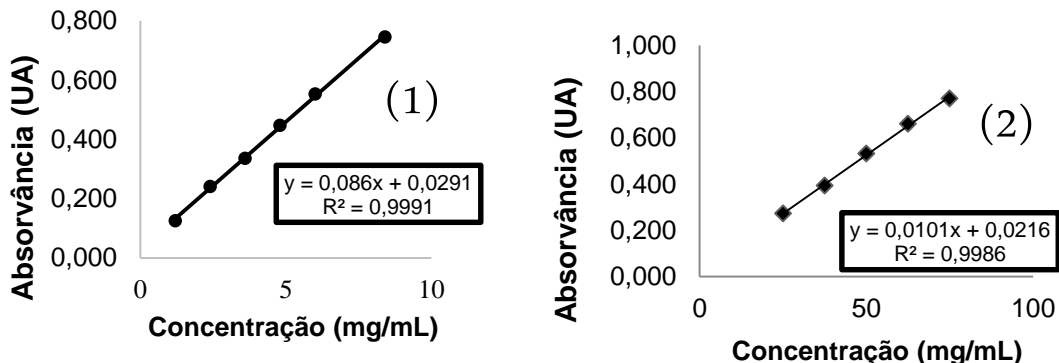
Leituras	α	α	t_{calc}	t_{tab}
	Curva da amostra	Curva padrão		
1	0,0865	0,0862	0,82	2,77
2	0,0865	0,0869		
3	0,0859	0,0865		
Média	0,0863	0,0865		
DP	0,0003	0,0004		
Interseção (b)	0,0291	0,2577		
R^2	0,9991	0,9994		

5.3.3 Linearidade

Curva de calibração da amostra e curva analítica do padrão

A linearidade do método espectrométrico foi verificada por meio da elaboração da curva de calibração da amostra na faixa de concentração de 1,2 a 8,4 mg/mL e da curva analítica do padrão na faixa de concentração de 25 a 75 µg/mL. A figura 13 mostra a média das três curvas autênticas da amostra e do padrão, respectivamente, para o teste da linearidade do método. Os coeficientes de determinação calculados pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados foram obtidos a partir da curva média de três curvas autênticas, tanto para o padrão quanto para amostra. Os dados obtidos revelam que proporção superior a 99% das variabilidades experimentais são explicados pelos modelos matemáticos encontrados para a amostra ($R^2 = 0,9991$) e para o padrão ($R^2 = 0,9986$). Comprovando, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respostas espectrométricas, atendendo os requisitos preconizados para análise desse parâmetro (> 99%) (BRASIL, 2003).

Figura 13 - Curvas de calibração para a amostra de *S. angustifolia* (1) e para a solução padrão (senosídeos A e B) (2).



5.3.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Conforme demonstrado na tabela 10, os resultados dos limites de detecção e quantificação indicam que o método analítico para a quantificação de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *S. angustifolia* exibe boa sensibilidade, sem interferência importante da técnica instrumental.

Tabela 10 - Ensaio dos limites de detecção e quantificação calculados para os frutos de *Senna angustifolia*.

Limites de Detecção e Quantificação		
Parâmetros	Equações	µg/mL
LD	$Dpa \times 3/IC$	0,2564
LQ	$Dpa \times 10/IC$	0,8547

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.

5.3.5 Precisão

Repetibilidade (intracorrída)

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos para o parâmetro de repetibilidade nos frutos de Sene. O teor médio de derivados hidroxiantracênicos foi de 1,03%, o baixo desvio padrão relativo (2,34%) demonstra que o método apresenta adequada precisão.

Tabela 11 - Ensaios de precisão intracorrida para a amostra de *S. angustifolia*.

n	Absorvância (UA)	Teor (g%)
1	0,441	1,1428
2	0,440	1,1402
3	0,456	1,1816
4	0,464	1,2024
5	0,458	1,1868
6	0,463	1,1998
Média	0,454	1,18
DP	0,011	0,0276
DPR%	2,34	2,34

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Precisão intermediária (intercorrida)

A tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação de derivados hidroxiantracênicos em *S. angustifolia*. O baixo desvio padrão relativo geral (DPR%) (2,86%) obtido e as análises obtidas através do tratamento estatístico por ANOVA *Two-Way* demonstram que o método é preciso para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, em virtude dos valores de *F* calculado terem sido inferiores aos valores do *F* tabelado.

Tabela 12 – Ensaio de precisão intercorrida para a amostra de *Senna angustifolia*.

	Dia 1 (g% de DH)	Dia 2 (g% de DH)
Analista 1	1,1481 ± 0,032 (2,80)	1,1334 ± 0,026 (2,26)
Analista 2	1,1455 ± 0,035 (3,05)	1,1481 ± 0,053 (4,58)
<i>F</i>_{dia}	0,078	
<i>F</i>_{analista}	0,078	

$$F_{(g1, g2, 0,05)} = 5,32$$

5.3.6 Exatidão

A tabela 13 mostra o resultado do ensaio de exatidão no teste de recuperação após a fortificação das soluções amostras com a solução padrão de concentrações conhecidas. Os dados encontrados demonstram que a recuperação ficou entre 94 e 110%. Deste modo, o procedimento pode ser considerado exato conforme limites especificados pelos compêndios oficiais (entre 80 e 120%) (BRASIL, 2003).

Tabela 13 -Teste de recuperação para a amostra de *Senna angustifolia*.

Amostra (mg/mL)	Padrão (µg/mL)	Valor teórico (UA)	Valor experimental (UA) média ± dp (dpr)	Recuperação (%)
2,40	37,5	0,594	0,591 ± 1,38 (1,70)	99,38
2,40	50,0	0,733	0,694 ± 0,30 (0,36)	94,72
2,40	62,5	0,872	0,954 ± 0,25 (0,30)	109,41

DP = desvio padrão; DPR%= Desvio padrão relativo.

5.3.7 Robustez

No método proposto, os parâmetros considerados críticos sobre a resposta analítica foram: preparação da amostra (etapa de evaporação da fração orgânica),

fornecedor do solvente e comprimento de onda. A tabela 14 apresenta os resultados obtidos com estas pequenas variações introduzidas no método observados através do teor de derivados hidroxiantracênicos. Os dados obtidos demonstram que o método é robusto em virtude do baixo desvio padrão relativo e do F calculado se encontrar abaixo do F tabelado, através do tratamento estatístico por ANOVA *One-Way*.

Tabela 14 - Ensaio de robustez para a amostra de *Senna angustifolia*.

Parâmetros	Variáveis	Média \pm DP (dpr)	F_{calc}
Preparação da amostra (Evaporação do CH ₃ Cl)	Banho-maria	1,154 \pm 0,0242 (2,22)	0,0614
	Chapa	1,134 \pm 0,0369 (3,25)	
Marca do solvente (Clorofórmio)	Cinética®	1,127 \pm 0,0428 (3,79)	0,898
	Quimex®	1,154 \pm 0,0242 (2,09)	
Comprimento de onda	513nm	1,149 \pm 0,0242 (2,10)	0,27
	515 nm	1,154 \pm 0,0242 (2,09)	
	517nm	1,165 \pm 0,0341 (2,93)	

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

$F_{(gl1,gl2, 0,05)} = 7,71$

5.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para as análises, foram injetadas, separadamente, 10 μ l da solução padrão e solução amostra, em triplicata. Os cromatogramas foram registrados e as áreas dos picos foram medidas. O tempo total de análise foi de 45 minutos. O tempo de retenção observado foi de aproximadamente 18,0 minutos para o senosídeo B e 20,7 minutos para o senosídeo A.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

5.5.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da comparação do espectro de varredura e do tempo de retenção da amostra de *S. angustifolia* e dos padrões senosídeo A e B. A figura 14 representa o espectro de varredura do senosídeo A (1) e do pico correspondente ao senosídeo A na amostra de *S. angustifolia* (2). Enquanto que a figura 15 apresenta o mesmo parâmetro (espectro de varredura e tempo de retenção), porém com os espectros do senosídeo B (1) e do pico correspondente ao senosídeo B amostra de *S. angustifolia* (2), cujo máximo de absorvância ocorre entre 201,0 e 203 nm. A figura 16 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra de *S. angustifolia* e para o padrão, mostrando a similaridade dos respectivos tempos de retenção. Nas condições estabelecidas, o tempo de retenção médio foi de 18,0 minutos para o senosídeo B e de 20,7 para o senosídeo A, sendo 45 minutos o tempo total de análise.

Figura 14 -Espectro de varredura do pico do padrão de senosídeo A (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao senosídeo A na amostra de *S. angustifolia* (2).

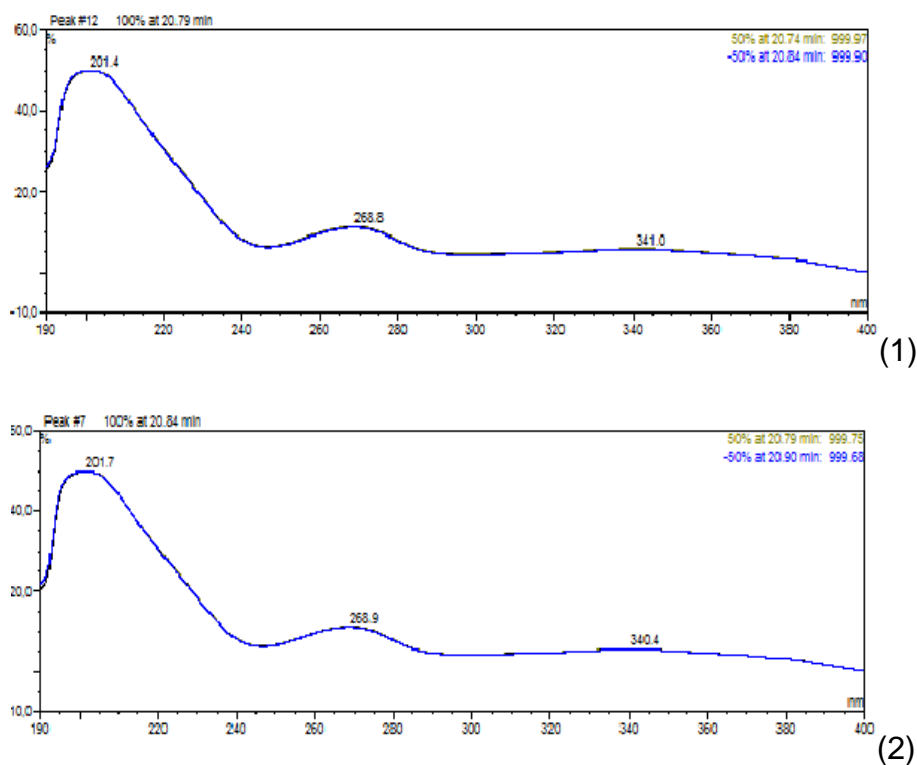


Figura 15 - Espectro de varredura do pico do padrão de senosídeo B (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao senosídeo B na amostra de *S. angustifolia* (2).

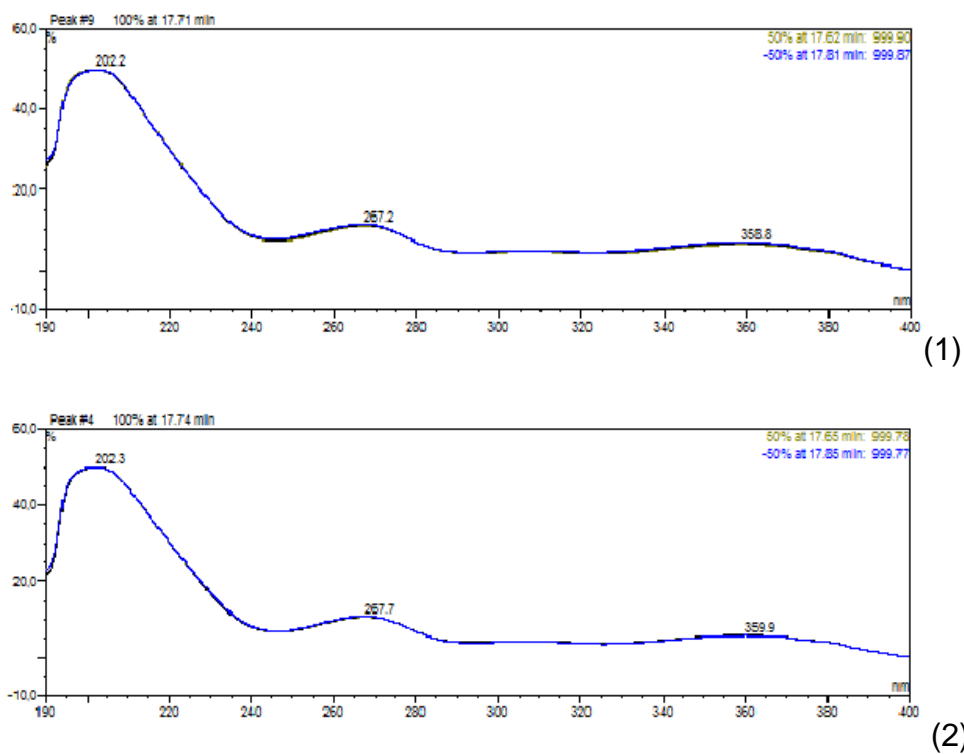
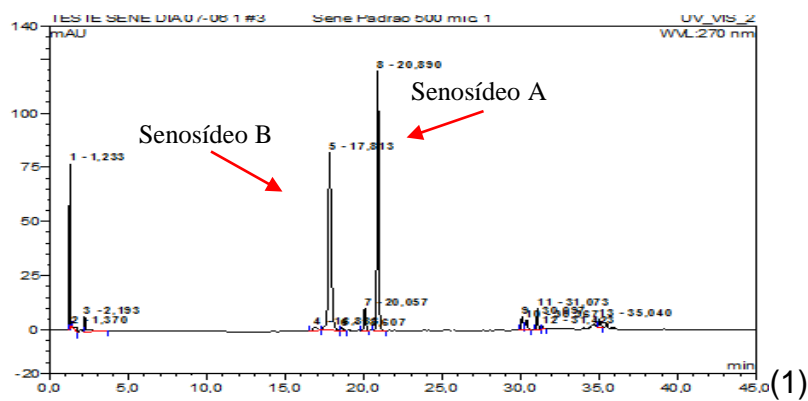
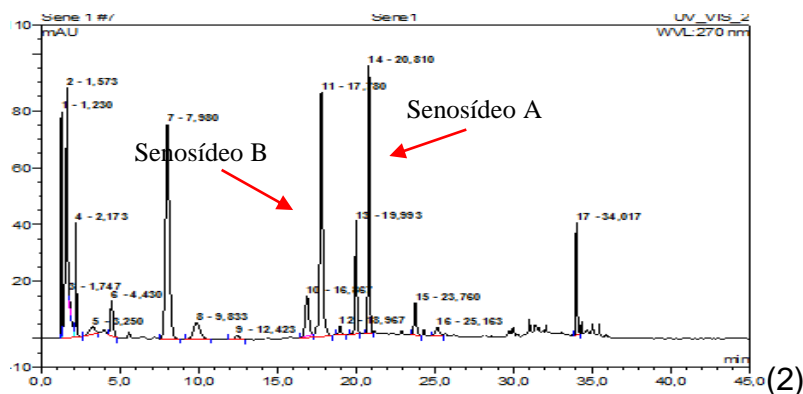


Figura 16 - Cromatogramas obtidos para asolução do padrão (senosídeos A e B) (1) e para a amostra dos frutos de *S. angustifolia* (2).





5.5.2 Linearidade

Curva de calibração da amostra e curva analítica do padrão

As curvas analíticas dos senosídeos A e B foram construídas a partir de três curvas independentes na faixa de concentração de 45,6 a 83,6 $\mu\text{g/mL}$ e 99,2 a 148,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A figura 17 mostra a curva de linearidade média obtida para o senosídeo A, com equação da reta obtida pela regressão linear igual a $y = 0,2329x - 2,7971$ e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9958$. A figura 18 mostra a curva de linearidade obtida para o senosídeo B, em que a média das curvas mostrou coeficiente de determinação $R^2 = 0,9982$ e a equação da reta de $y = 0,1583x - 1,0215$.

Figura 17 -Curva de calibração média para a solução padrão do senosídeo A.

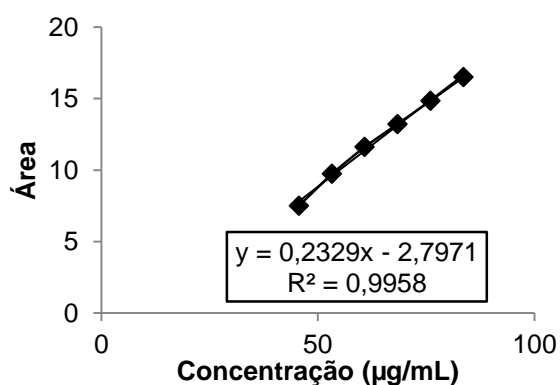
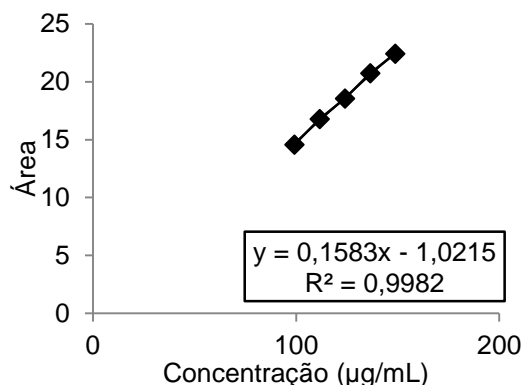


Figura 18 -Curva de calibração média para a solução padrão do senosídeo B.



Após a avaliação do padrão, o método analítico foi testado para a droga vegetal de *S. angustifolia*. Assim, três curvas analíticas na faixa de concentração de 1,3 a 13,9 mg/mL foram elaboradas. As curvas médias da amostra para o senosídeo A (figura 19) e para o senosídeo B (figura 20) apresentaram coeficiente de determinação e equação da reta igual a 0,9997 e $y = 1,1563x - 0,0633$ e 0,999 e $y = 1,8706x - 0,02$, respectivamente.

Os resultados obtidos comprovam, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respectivas áreas dos picos, atendendo aos requisitos preconizados pela legislação em vigor para análise desse parâmetro ($R^2 > 99\%$).

Figura 19 -Curva de linearidade para o pico do senosídeo A em amostras de *S. angustifolia*.

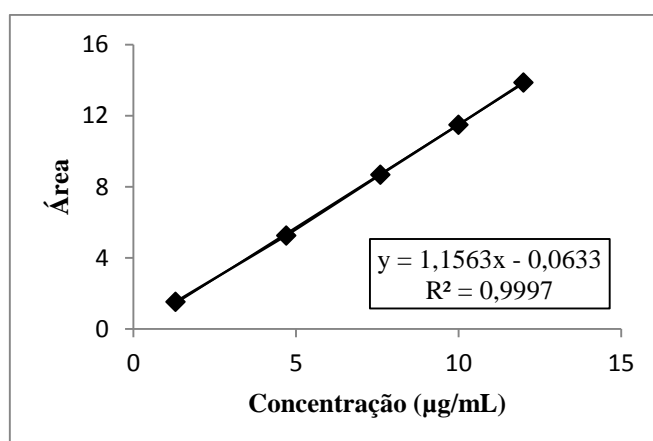
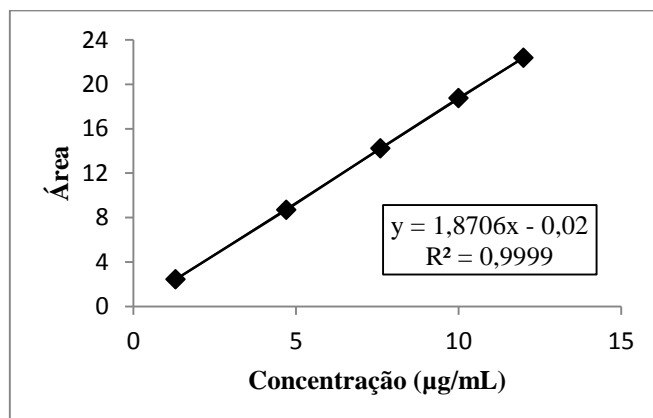


Figura 20 -Curva de linearidade para o pico do senosídeo B em amostras de *S. angustifolia*.



5.5.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Conforme observado na tabela 15, os resultados dos limites de detecção e quantificação indicam que o método analítico para a quantificação dos senosídeos A e B nos frutos de *S. angustifolia* exibe boa sensibilidade, sem interferência da técnica instrumental.

Tabela 15 -Resultados dos limites de detecção e quantificação calculados para o senosídeo A e B nos frutos de *Senna angustifolia*.

Limites de Detecção e Quantificação			
Parâmetros	Equações	SENOSÍDEO A (µg/mL)	SENOSÍDEO B (µg/mL)
LD	Dpa x 3/IC	0,23	1,88
LQ	Dpa x 10/IC	0,76	6,25

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.

5.5.4 Precisão

Repetibilidade (intracorrída)

A tabela 16 apresenta os resultados dos teores obtidos no ensaio de repetibilidade para os senosídeos A e B para o método de quantificação de

senosídeos nos frutos de *S. angustifolia* por CLAE. Esse teste foi realizado em sextuplicata no mesmo dia e pelo mesmo operador. O teor médio de senosídeo A encontrado na amostra foi de 0,0067 g% e de senosídeo B foi de 0,0135 g%. Os baixos desvios padrão relativo (DPR%) obtidos de 2,38 e 1,71%, respectivamente, demonstraram que o método apresenta precisão adequada.

Tabela 16 - Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de senosídeos A e B nos frutos de Sena por CLAE.

AMOSTRAS	SENOSÍDEO A (g%)	SENOSÍDEO B (g%)
1	0,0066	0,0133
2	0,0069	0,0136
3	0,0066	0,0135
4	0,0068	0,0136
5	0,0067	0,0139
6	0,0064	0,0132
MÉDIA ± DP (DPR%)	0,0067 ± 0,00016 (2,38%)	0,0135 ± 0,00023 (1,71%)

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Precisão intermediária (intercorrida)

A tabela 17 apresenta os teores dos senosídeos A e B para o teste da precisão intermediária para o método de quantificação simultânea dos senosídeos nos frutos de *S. angustifolia* por CLAE, realizado por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes. O baixo desvio padrão relativo geral (DPR%) (2,86%) demonstra que o método apresenta precisão apropriada visto que esse valor encontra-se abaixo do limite estabelecido pela legislação vigente (5%) (BRASIL, 2003).

Tabela 17 - Resultados do ensaio de precisão intermediária do senosídeo A e B.

TEOR (g%) ± DP (DPR%)				
Operador	Senosídeo	Dia 1	Dia 2	Interdia
1	A	0,0068 ± 0,0002	0,0066 ± 0,0003	0,0067 ± 0,0001
		(3,39%)	(4,29%)	(2,32%)
	B	0,0140 ± 0,0002	0,0135 ± 0,0002	0,0138 ± 0,0004
		(1,75%)	(1,13%)	(2,57%)
2	A	0,0067 ± 0,0003	0,0064 ± 0,0003	0,0066 ± 0,0002
		(4,38%)	(4,17%)	(3,24%)
	B	0,0139 ± 0,0002	0,0132 ± 0,0002	0,0136 ± 0,0005
		(1,77%)	(1,34%)	(3,65%)

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

5.5.5 Exatidão

As tabelas 18 e 19 mostram os resultados do ensaio de exatidão após a fortificação de soluções amostras de concentração fixa (10 mg/mL) com soluções padrão de concentrações conhecidas em 3 níveis crescentes de concentrações (80, 100 e 120%). Os valores de teor esperados foram calculados e comparados com os dados experimentais. Assim, a recuperação encontra-se em torno de 101% para o senosídeo A e entre 97 e 99% para o senosídeo B, demonstrando que a exatidão do método desenvolvido foi alcançada. Deste modo, o procedimento pode ser considerado exato conforme limites especificados pelos compêndios oficiais de recuperação (entre 80 a 120%).

Tabela 18 - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do senosídeo A na solução amostra dos frutos de *S. angustifolia*.

Exatidão Padrão Senosídeo A (Área)		Amostra Sene (10 mg/mL) (Área)	Valor teórico (Área)	Concentração teórica (y = 0,2329x - 2,7971)	Valor prático_Média (Área)	Concentração prática (y = 0,2329x - 2,7971)	Recuperação (%)
Conc. µg/mL	Média ± DP (DPR)	Média ± DP (DPR)					
68,4	13,220 ± 0,0911 (0,69%)	10,656 ± 0,2635 (2,47%)	11,938	63,27 µg/mL	12,157 ± 0,0187 (0,15%)	64,21 µg/mL	101,48
76,0	14,852 ± 0,0684 (0,46%)		12,754	66,77 µg/mL	12,933 ± 0,0474 (0,37%)	67,54 µg/mL	101,15
83,6	16,517 ± 0,0398 (0,24%)		13,587	70,35 µg/mL	13,833 ± 0,0194 (0,14%)	71,40 µg/mL	101,49

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Tabela 19 - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do senosídeo B na solução amostra dos frutos de *S.angustifolia*.

Exatidão Padrão Senosídeo B		Amostra Sene (10 mg/mL)	Valor teórico	Concentração teórica ($y = 0,1583x - 1,0215$)	Valor prático_Média	Concentração prática ($y = 0,1583x - 1,0215$)	Recuperação (%)
Conc. µg/mL	Média ± DP (DPR)	Média ± DP (DPR)					
111,6	16,7689 ± 0,1978 (1,18%)	17,670 ± 0,2046 (1,16%)	17,220	115,23 µg/mL	16,797 ± 0,1003 (0,60%)	112,56 µg/mL	97,68
124,0	18,5571 ± 0,2704 (1,46%)		18,114	120,88 µg/mL	17,853 ± 0,0791 (0,44%)	119,23 µg/mL	98,64
136,4	20,7297 ± 0,0811 (0,39%)		19,200	127,74 µg/mL	19,015 ± 0,0153 (0,08%)	126,57 µg/mL	99,08

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

5.5.6 Robustez

A tabela 20 apresenta o resultado obtido com as pequenas variações introduzidas no método observados através do teor de senosídeos A e B, respectivamente. No método proposto, os parâmetros considerados críticos sobre a resposta analítica foram: fluxo da fase móvel, pH da fase A (aquosa) e temperatura da coluna. Os dados obtidos demonstram que o método é robusto em virtude do baixo desvio padrão relativo e do F calculado se encontrar abaixo do F tabelado, através do tratamento estatístico por ANOVA *One-Way*.

Tabela 20 - Ensaios de robustez nos frutos de *S. angustifolia* por CLAE.

Parâmetro	Variáveis	SENOSÍDEO A		SENOSÍDEO B	
		Média ± DP (DPR%)	F_{calc}	Média ± DP (DPR%)	F_{calc}
FLUXO DA FASE MÓVEL	0,8 mL/min	0,0068 ± 0,0002 (2,29%)	0,31	0,014 ± 0,0001 (1,03%)	4,30 E-05
	1,0 mL/min	0,0068 ± 0,0001 (2,01%)		0,014 ± 0,0005 (3,49%)	
pH DA FASE MÓVEL A	1,7	0,007 ± 0,0003 (3,95%)	1,2	0,0131 ± 0,0001 (0,79%)	8,40 E-05
	1,9	0,007 ± 0,0002 (2,83%)		0,0131 ± 0,0001 (0,70%)	
TEMPERATUR A DA COLUNA	22 °C	0,007 ± 0,0003 (3,85%)	1,46	0,014 ± 0,0005 (4,03%)	2,40 E-01
	25 °C	0,007 ± 0,0002 (2,92%)		0,0134 ± 0,0003 (2,41%)	

DP = desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

$F_{(3,3; 0,05)} = 7,71$

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O teor de derivados hidroxiantracênicos nos frutos de *Senna angustifolia* Vahl encontrado no método espectrofotométrico desenvolvido permaneceu superior aos teores testados e obtidos pelos métodos presentes na Farmacopeia Brasileira e na Farmacopeia Britânica, podendo-se confirmar que, além deste método ser de mais fácil execução, mais simples e rápido, é mais eficiente ao quantificar a totalidade destes metabólitos.

Um método por CLAE também foi avaliado, tendo em vista a ausência de um método cromatográfico na Farmacopeia Brasileira para o doseamento de senosídeos nos frutos de *S. angustifolia*. O método avaliado mostrou-se simples, rápido e robusto para a detecção e quantificação simultânea dos senosídeos A e B nesta droga vegetal, sendo estes considerados os marcadores analíticos e farmacológicos para a espécie.

Os dois procedimentos analíticos para determinação e quantificação de derivados hidroxiantracênicos totais e senosídeos A e B avaliados neste trabalho, apresentaram adequação aos parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03. Estas metodologias mostram-se disponíveis como técnicas específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas. Desta forma, os procedimentos puderam ser considerados validados para o fim que se propõem.

Por fim, foi possível concluir que, independente das metodologias, ambos os procedimentos avaliados neste estudo estão apropriados ao emprego como ferramenta de controle de qualidade para a droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *S. angustifolia* Vahl.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABADI, M. D. M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1-12, 2012.

AHMED, M. J.; MURTAZA, G. A study of medicinal plants used as ethnoveterinary: Harnessing potential phytotherapy in Bheri, District Muzaffarabad (Pakistan). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 209–214, 2015.

ALI, M. S.; AZHAR, I.; AMTUL, Z.; AHMAD, V. U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of some Caesalpiniaceae. **Fitoterapia**, v. 70, p. 299-304, 1999.

ALMEIDA, R. B. de.; SCHEFFER, T. P. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. **Revista de Saúde Pública**, Santa Catarina, v. 5, n. 1, p. 59-71, 2012.

ARAÚJO, L. B. D. C.; SILVA, S. L.; GALVÃO, M. A. M.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, E. L., RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 736-742, 2013.

BABU, K. S.; TIWARI, A. K.; SRINIVAS, P. V.; ALI, A. Z.; RAJU, B. N.; RAO, M. Yeast and mammalian α -glucosidase inhibitory constituents from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. ex Meisson. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3841-3845, 2004.

BARROS, C. S. L.; LLHA, M. R. S.; BEZERRA P. S.; LANGOHR, I. M.; KOMMERS, G. D. Intoxicação por *Senna occidentalis* em bovinos em pastoreio. (Leg. Caesalpinoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 68-70, 1999.

BOONCHAI, P.; MOTONOBU, G.; MITSURU, S.; THITIPORN, A.; PRASERT, P.; ARTIWAN, S. Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 390–396, 2006.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de

secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRASIL. RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 02/06/2003.

BRASIL. RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 08/05/2014.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London, 2012.

BRITO, N. M.; AMARANTE-JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUSICK, D.; MENGES, U. Assessment of the Genotoxic Risk From Laxative *Senna* Products. **Environ Mol Mutagen**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1997.

CALORE, E. E.; WEG, R.; HARAGUCHI, M.; CALORE, N. M.; CAVALIERE, M. J.; SESSO, A. Mitochondrial metabolism impairment in muscle fibres of rats chronically intoxicated with *Senna occidentalis* seeds. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 52, n. 4, p. 357-63, 2000.

CAMACHO, M. R.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, n. 66, v. 5, p. 478-480, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. de G.; BARATELLI, T. de G.; MAHMUD, N. S.; SHUQAIR, S. A. Q.; NET, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, n 11, 2007.

CHAKRABARTY, K.; CHAWLA, H. Terpenoids and phenolics from *Cassia* species stem bark. **Indian Journal Chemistry**, v. 22, p. 1165-1166, 1983.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHIANG, H. M.; LIN, Y. T.; HSIAO, P. L.; SU, Y. H.; TSAO, H. T.; WEN, K. C. Determination of Marked Components-aloin and aloe-emodin-in *Aloe vera* before and after hydrolysis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 3, p. 646-652, 2012.

CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4^a ed., Lisboa, Portugal. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 248-259, 1994.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 555 p., 1988.

DAVE, H.; LEDWANI, L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 3, n. 3, p. 291-319, 2012.

DUTRA, V. F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C. Mimosoideae (Leguminosae) nos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi. **Rodriguésia**, Minas Gerais, v. 59, n. 3, p. 573-585, 2008.

EPIFANO, F.; FIORITO, S.; LOCATELLI, M.; TADDEO, V. A.; GENOVESE, S. Triagem para novas fontes vegetais de prenyloxanthraquinones: *Senna Alexandrina* Mill. e *Aloe vera* (L.) Burm. F. **Natural Product Research**, v. 29, n. 2, p. 180-4, 2015.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Universidade-UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 657-683, 2007.

FARAG, M. A.; PORZEL, A.; MAHROUS, E. A.; EL-MASSRY, M. M.; WESSJOHANN, L. A. Integrated comparative metabolite profiling via MS and NMR techniques for *Senna* drug quality control analysis. **Anal Bioanal Chem**, v. 407, n. 7, p. 1937-49, 2015.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 5ª ed. Brasília, 2010.

FORERO, E. Introducción. In: FORERO, E.; ROMERO, C. **Estudios en leguminosas colombianas**, Colombia, Bogotá, 2005.

GILL, N. S.; SHARMA, A.; ARORA, R.; BALI, M. Evaluation of *Cassia* species seeds for their antioxidant and antiulcer activity. **Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 96-101, 2011.

GOPPEL, M.; FRANZ, G. Stability control of *Senna* leaves and *Senna* extracts. **Planta Medica**, v. 70, p. 432-436, 2004.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Cap. 1, p. 13-28, 2010.

GUNN, C. R. Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). **Technical Bulletin No 1681**, p. 1-194, 1984.

GUPTA, D. P. The herbs, Habitat, Morphology and Pharmacognosy of Medicinal Plants, p. 357-358, 2008.

HARNISCHFEGER, G.; STOLZE, H. Bewährte Pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin. **Bad Homburg: Notamed**, p. 288, 1983.

HAYTAA, S.; POLATB, R.; SELVIC, S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 613–623, 2014.

HEFNAWY, M. M.; SULTAN, M. A.; AL-SHEHRI, M. M. Direct enantiomeric resolution of betaxolol with application to analysis of pharmaceutical products. **Analytical Chemistry Insights**, v. 1, p. 13-20, 2006.

HUSSAIN, S.; SIDDIQUI S. U.; KHALID S.; JAMAL A.; QAYYUM A.; AHMAD Z. Allelopathic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) on germination and seedling characters of some major cereal crops and their associated grassy weeds. **Pakistan journal of botany**, v. 39, n. 4, p. 1145-1153, 2007.

ICH, **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A**. "Text on Validation of Analytical Procedures" March, 1995; Geneva, 1994. 2005.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. The American Cassinae: a synoptical revision of Leguminosae, Tribe Cassieae subtribe Cassinae in the New World. **Memoires of the New York Botanical Garden**, v. 35, p. 1-918, 1982.

IZZO, A. A.; SAUTEBIN, L.; BORRELLI, F.; LONGO, R., CAPASSO, F. The role of nitric oxide in aloe-induced diarrhoea in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 368, n. 1, p. 43-48, 1999.

JIANG, M. A.; LI ZHENG; YI-SHENG, ELE.; HUI-JUN, LI. Hepatotoxic assessment of *Polygoni Multiflori* Radix extract and toxicokinetic study of stilbene glucoside and anthraquinones in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 61–68, 2015.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal – um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009.

KHAN, M. A.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; SULTANA, S.; SHAHEEN, S.; LEGHARI, M. K.; JAN, G.; AHMAD, F.; NAZIR, A. Medico-botanical and chemical standardization of pharmaceutically important plant of *Tricholepis chaetolepis* (Boiss.). **J. Med. Plants Res**, v. 5, n. 8, p. 1471-1477, 2011.

KHAN, N. A.; SRIVASTAVA, A. Antifungal activity of bioactive triterpenoid saponin from the seeds of *Cassia angustifolia*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 12, p. 1128-33, 2009.

KHAN, S.; MIRZA, K. J.; AL-QURAINY, F.; ABDIN, M. Z. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 287-292, 2011.

KINJO, J.; IKEDA, T.; WATANABE, K.; NOHARA, T. An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1685-1687, 1994.

KIRKBRIDE JÚNIOR, J. H.; GUNN, C.R.; WEITZMAN, A. L. Fruits and Seeds of Genera in the Subfamily Faboideae (Fabaceae). U. S. Department of Agriculture, **Technical Bulletin No. 1890**, p. 1, 212 pp. v. 1, 2003.

KOMAROVA, N. I.; ROGACHEV, A. D.; CHERNYAK, E. I.; MOROZOV, S. V.; FOMENKO, V.; SALAKHUTDINOV, N. F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, p. 27-31, 2009.

KUMAR, A.; DHAWAN, S.; AGGARWAL, B. B. Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-KB activation, IKB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. **Oncogene**, v. 17, n. 7, p. 913–918, 1998.

KURKIN, V. A.; SHMYGAREVA, A. A. The development of new approaches to standardization of *Cassia acutifolia* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 3, p. 163-167, 2014.

LAGHARI, A. Q.; MEMON, S.; NELOFAR, A.; LAGHARI, A. H. Extraction, Identification and Antioxidative Properties of the Flavonoid-Rich Fractions from Leaves and Flowers of *Cassia angustifolia*. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 871-878, 2011.

LEMLI, J.; CUVEELA, J. Chromatography of anthrone glycosides of purgative drug. **Planta Medica**, v. 26, n. 193, 1974.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKNIDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Garden. Kew Scientist, 2005.

LIMA, H.C. Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 151p. 2000.

LIMA, H.C. DE; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S. F; SOUZA, E.R. DE.; e colaboradores. Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 03 Mai. 2015

LIRA, E. C.; SANTOS, V. L.; SILVA, J. A. Avaliação da Atividade antiulcerogênica do extrato bruto da raiz *Cassia occidentalis* L. (Mangerioba). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, p. 53-56, 2005.

LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z. Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1-2, p. 55-111, 1992.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

MA, J.; ZHENG, L.; HE, Y. S.; LI, H. J. Hepatotoxic assessment of *Polygoni Multiflori* Radix extract and toxicokinetic study of stilbene glucoside and anthraquinones in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, n. 13, p. 61–68, 2014.

MACIEL, M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKKY, E. A.; MASHITAH, M. Y.; IBRAHIM, M. M. Impact of Medicinal Plants Phytocomponents against Antibiotic Resistant Bacteria. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 1, p. 881-893, 2012.

MALIK, S.; SHARMA, N.; SHARMA, U. K.; SINGH, N. P.; BHUSHAN, S.; SHARMA, M.; SINHA, A. K.; AHUJA, P. S. Qualitative and quantitative analysis of anthraquinone derivatives in rhizomes of tissue culture-raised *Rheum emodi* Wall. Plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 749–756, 2010.

MARQUES, G. S.; LEO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; NETO, P. J. R.; SOARES, L. A. L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 51-57, 2013.

MCKEY, D. Interactions between ants and leguminous plants. In: Stirton, C. H. e Zarucchi, J. L. (eds.) **Advances in Legume Biology**. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden 29, p. 673-718, 1989.

MITCHELL, J. M.; MENGES, U.; MCPHERSON, S.; ZIJLSTRA, J.; DETTMAR, P.; GREGSON, R.; TIGNER, J. C. An oral carcinogenicity and toxicity study of *Senna* (Tinnevely senna fruits) in the rat. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 1, p. 34-44, 2006.

MOHANTY, P. K.; PANDA, P. K.; PATRO, V. J.; PANDA, S. K.; PAND, C. M. S. Antiulcer Activity of Methanolic Extract of *Cassia angustifolia* Bark and Its Comparison

with Ranitidine in Shay Rat. **Research journal of pharmacy and technology**, v. 3, n. 3, p. 812-814, 2010.

MORALES, M. A.; HERNÁNDEZ, D.; BUSTAMANTE, S.; BACHILLER, I.; ROJAS, A. Is senna laxative use associated to cathartic colon, genotoxicity, or carcinogenicity? **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1-8, 2009.

MUKHARJEE, P. K.; SAHA, K. DAS J.; SAHA, B. P.; PAL, M. Antifungal activity of the leaf extract of *Cassia tora* species linn. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 521-522, 1996.

NADIR, A.; REDDY, D.; VAN THIEL, D. H. Cáscara sagrada –induced intrahepatic cholestasis causing portal hypertension: case report and review of herbal hepatotoxicity. **American Journal of Gastroenterology**, v.95, n. 12, p. 3634-3637, 2000.

NEWMAN, D. G.; CRAGG, G. M. Natural products sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. 1.ed. São Paulo: Santos, 2010.cap. 1, p.1-15.

OLIVEIRA, A. L. S.; RIBEIRO, G. C. A.; JESUS, G. S.; SANTANA, T. T. O.; COSTA, J. A.; BRANDÃO, H. N. Avaliação da qualidade de amostras de *Senna alexandrina* Miller comercializadas em três estabelecimentos de Feira de Santana, Bahia. **Ex@tasonline**, vol. 3, n. 2, p. 25-30, 2012.

PALAMICHAMY, S.; AMALA, B.; NAGARAGAN, S.; **Fitoterapia**, v. 62, p. 249, 1991.

PELOZO, M. I. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELLO, J. C. P. de. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. sorbilis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3.p. 447-51, 2008.

PEREZ, Y. B; JIMENEZ, M. E. H; PULPEIRO, O. G. Desarrollo de una técnica analítica para cuantificar las antraquinonas presentes en la *Senna alata* (L.) Roxb. (Guacamaya francesa). **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v.10, n.3-4, 2005.

PERON, A. P.; MARCOS, M. C.; CARDOSO, S. C.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl em sistema teste vegetal. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 12, n. 1, p. 51-54, 2008.

RAJ, T. L. S.; BRITTO, A. J.; KUMAR, P. B. J. R. RAPD – PCR fingerprint analysis of *Cassia angustifolia* Vahl.in Tirunelveli District of Tamil Nadu. **International Journal of Biological Technology**, v 2, n 3, p. 17-20, 2011.

RAJU, S; SHAH, S; GAJBHIYE, N. Effect of light intensity on photosynthesis and accumulation of sennosides in plant parts of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.).**Indian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 285–289, 2013.

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

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria uv-vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 709-720, 2006.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

SAKULPANICH, A.; GRITSANAPAN, W. Determination of anthraquinone glycoside content in *Cassia fistula* leaf extracts for alternative source of laxative drug. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 42-45, 2009.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India.**Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 63–71, 2000.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BEZERRA, R. J. A. C. Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 14, n. 1, p. 01-03, 2004.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; ROCHA, H. M.; RIBEIRO, A. F.; Caldeira-de-Araujo, A.; LEITÃO, A. C.; BEZERRA, R. J. A. C.; PÁDULA, M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 212–218, 2008.

SILVA-CORAZZA, P. E. R.; LOPES, G. C.; DÍCIAULA, M. C.; LIMA, M. M. S.; MELLO, J. C. P. de. Pharmaceutical topical gel: development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of polyphenols. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.5, p.1-5, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6ª ed., Editora UFSC, UFRGS Editora, cap. 25, 2007.

SINGH, V. K.; KHAN, A. M. Medicinal Plants and Folklores - A Strategy towards Conquest of Human Ailments.v. 9. **Today & Tomorrow Printers & Publishers**, 1990:67.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; Dolan, J. W. **Introdução de Cromatografia Líquida moderna** (3rd ed.) John Wiley & Sons (2010).

SOUSA, O. V., OLIVEIRA, M. S., CUNHA, R. O., COSTA, B. L. S., ZANCANELLA, C. R., LEITE, M. N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 30-34, 2003.

SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23149>>. Acesso em: 04 Dez. 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SOYUNCU, S.; CETE, Y.; NOKAY, A. E. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. **Clinical Toxicology (Philadelphia)**, v. 46, n. 8, p. 774-777, 2008.

SULTANA, S.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; KHAN, M. A.; ARSHAD, M. Authentication of herbal drug Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): A village pharmacy for Indo-Pak Subcontinent. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 6, n. 30, p. 2299-2308, 2012.

SUN, S. W.; SU, H. T. Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 881-894, 2002.

TASAKA, A. C. Estudo da toxicidade da *Senna occidentalis* em coelhos. I – Avaliação em animais durante a fase de crescimento. II – Efeitos perinatais. 120 f. Tese (Doutorado em ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, p. 148–161, 2011.

UPADHYAY, A.; CHANDEL, Y.; NAYAK, P. S.; KHAN, N. A. Sennoside contents in Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) as influenced by date of leaf picking, packaging material and storage period. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 97-103, 2011.

VAN GORKOM, B. A.; DE VRIES, E. G.; KARRENBELD, A.; KLEIBEUKER, J. H. Review article: Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, p. 443–452, 1999.

VAN OS, F. H. L. Anthraquinone derivatives in vegetables laxatives. **Pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 7-17, 1976.

VIEGAS JR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-86, 2006.

VITALONE, A.; DI GIACOMO, S.; DI SOTTO, A.; FRANCHITTO, A.; MAMMOLA, C. L.; MARIANI, P.; MASTRANGELO, S.; MAZZANTI, G. *Cassia angustifolia* extract is not hepatotoxic in an *in vitro* and *in vivo* study. **Farmacologia**, v. 88, n. 5-6, p. 252-9, 2011.

WYREPKOWSKI, C. C.; DA COSTA D. L. M.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; DOS SANTOS, L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039–16057, 2014.

YAGI, T.; MIYAWAKI, Y.; NISHIKAWA, A.; YAMAUCHI, K.; KUWANO, S. Suppression of the purgative action of rheinanthrone the active metabolite of sennosides A and B by indomethacin in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 307-310, 1991.