

Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcalóides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L.

Marcos A.C. Oliveira¹, Miracy M. Albuquerque^{1*}, Haroudo S. Xavier², Ruth R. Strattmann¹, Severino Grangeiro Júnior¹, Adelaide T. Queiroz³

¹Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

²Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

³Diniz & Brandão S.A. Indústria e Comércio, Jaboatão dos Guararapes-PE. Praça Severina Rita Coelho, 21/43, Cavaleiro, 54250-600, Jaboatão dos Guararapes-PE, Brasil

RESUMO: A Robusterina[®] é um produto fitoterápico, com eficácia no tratamento de disfunções do ciclo menstrual. Em sua composição encontram-se *Berberis vulgaris* L., de ação sedativa e antiespasmódica; *Gossypium herbaceum* L., emenagoga, hemostática e ocitócica; *Viburnum opulus* L., antiespasmódico nas cólicas menstruais. De acordo com a Resolução RDC N° 48, de 16 de março de 2004, observa-se que o produto adequa-se na definição de Fitoterápico. A presença de alcalóides em *Berberis vulgaris* e a ausência de metodologias analíticas de quantificação para o produto, nos incentivaram a propor e validar um método apoiando-nos na Resolução RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Tal metodologia fundamenta-se na determinação espectrofotométrica de alcalóides utilizando-se Dragendorff como reagente precipitante, e o sulfato de berberina Merck[®], como substância química de referência. A curva de calibração foi determinada com seis concentrações entre 40 e 200 µg/mL. A equação da reta é $y = 0,0038x + 0,0092$ com R^2 de 0,9996. Os parâmetros robustez, precisão, especificidade, limite de detecção e quantificação e exatidão foram avaliados estatisticamente com intervalo de confiança de 95% (teste t de Student, ANOVA).

Unitermos: Robusterina[®], fitoterápico, validação, alcalóides, doseamento.

ABSTRACT: “Development and validation of a method for the quantification of total alkaloids as berberine in an herbal medicine containing *Berberis vulgaris* L.”. Robusterina[®] is a herbal medicine, with effectiveness in the treatment of menstrual cycle dysfunctions. Its composition includes *Berberis vulgaris* L., with sedative and antispasmodic action; *Gossypium herbaceum* L., with emmenagogue, hemostatic and ocitocic action; *Viburnum opulus* L., with antispasmodic action for the treatment of menstrual colics. In accordance with Resolution RDC N° 48, of 16 of March of 2004 (ANVISA, Brazil) the product meets the definition of “Fitoterápico” (phytotherapeutic agent). The presence of alkaloids in *Berberis vulgaris* and the absence of analytical methodologies for quantification of the product, stimulated us to develop and validate a method in accordance with Resolution RE N° 899, of 29 of May of 2003. Such methodology is based on the determination of alkaloids using a spectrophotometric method, with Dragendorff as a precipitating reagent, and using berberine sulphate, as a standard. The calibration curve was determined with six concentrations ranging between 40 and 200 µg/mL. The equation of the calibration curve is $y = 0.0038x + 0.0092$ with R^2 of 0.9996. The parameters robustness, precision, specificity, limit of detection and quantification and accuracy have been evaluated using 95% confidence interval (test t of Student, ANOVA).

Keywords: Robusterina[®], herbal medicine, validation, alkaloids, quantification.

INTRODUÇÃO

A Robusterina[®] é um medicamento (solução oral) de origem exclusivamente vegetal. Encontra-se no mercado nacional desde 1932, sendo utilizada no tratamento das disfunções e regulação do ciclo menstrual e, por estimular a contração uterina, seu uso é contra-indicado no período gestacional. A dose média diária é de

uma colher de sopa (15 mL) 3 vezes ao dia. O tratamento deve ser suspenso quando houver normalização do ciclo menstrual, ou no caso de gravidez. Apresenta-se em sua constituição três plantas: *Berberis vulgaris*, *Gossypium herbaceum* e *Viburnum opulus*.

Para o estudo, foi dada ênfase a *Berberis vulgaris*, pois é a única planta que apresenta na sua constituição alcalóides, para a qual foi desenvolvida

e validada uma metodologia analítica baseada na determinação espectrofotométrica de alcalóides, utilizando Dragendorff como reagente precipitante.

Berberis vulgaris, é uma Berberidaceae arbustiva com uma altura de 2 a 3 metros (Alonso, 1998). É nativa da Europa e Ásia Oriental, e, na atualidade, encontrada também no Norte da África e partes da América e Ásia Central (PDR for Herbal Medicines, 2000).

Apresentando uma vasta sinonímia vulgar, é conhecida como agracejo (espanhol) (Bruneton, 1991), barberry (inglês), bérberis (português), crespino (italiano) (Alonso, 1998) e épine-vinette (francês) (Duke, 1985). Apresenta outros nomes como berberry, pipperridge, jaundice berry, sow berry, mountain grape e oregon grape (PDR for Herbal Medicines, 2000). As partes da planta utilizadas para uso medicinal são os frutos, a casca da raiz e as folhas (Alonso, 1998).

Os frutos têm em sua constituição dextrose, levulose, ácido cítrico, ácido tartárico, goma e pectina (Alonso, 1998). Na casca das raízes são encontrados alcalóides como a berberina, palmatina, columbamina, berbamina, oxyacantina e magnoflorina perfazendo um total de 3% em alcalóides, o que confere ao córtex uma coloração amarela. A atividade farmacológica da planta é atribuída aos alcalóides presentes, principalmente a berberina (Pizzorno; Murray, 1985). A berberina está presente em outras famílias de plantas (Papaveraceae, Ranunculaceae, etc) (Alonso, 1998). Também são encontrados ácidos málico, cítrico, chelidônico e tartárico, além de resina e taninos (Duke, 1985).

Em concentrações normais (até 500 mg) (<http://www.fredmeyer.com/Es-Herb/Barberry.htm>), a berberina é um alcalóide com propriedades digestivas, eupépticas (carminativas), orexígenas (Alonso, 1998), febrífuga e, externamente, é utilizado como analgésico em dores provocadas pela úlcera (Duke, 1985). São também atribuídos a berberina, ações antisséptica e ocitócica (Cunha et al., 2003) e uma atividade uterina (Farnsworth, 1975), antiinflamatória (Barbosa-Filho et al., 2006a) e inibidor da enzima acetilcolinesterase (Barbosa-Filho et al., 2006b). Possui ação antimicrobiana (Pizzorno; Murray, 1985). Mostrou-se eficaz no tratamento de diarreias causadas por enterotoxinas, como *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (Preininger, 1975). Tradicionalmente a raiz é usada para o tratamento de litíase biliar (Bruneton, 1991). O sulfato de berberina tem apresentado atividades frente a tumores tipo B1, RB e PS (Fernald, 1958).

A Resolução RDC N° 48, de 16 de Março de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), regula o registro dos medicamentos fitoterápicos e, exige relatório de controle de qualidade, incluindo então as metodologias analíticas. A falta de metodologia analítica para a *Berberis vulgaris*, levou-nos a desenvolver uma metodologia analítica para o produto, a qual foi validada, de acordo com a Resolução RE N° 899, de 29 de Maio de 2003, do Ministério da Saúde (ANVISA,

2003). De acordo com esta resolução, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados parâmetros relacionados: Especificidade/Seletividade, Curva de Calibração/Linearidade, Intervalos de Curva de Calibração, Precisão, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Exatidão e Robustez.

A validação da metodologia analítica é de grande importância para a Garantia da Qualidade Analítica e se constitui numa das exigências das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes. Os métodos de ensaio para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (Barros, 2002; Ribeiro et al., 2005; Bara et al., 2006; Martins; Brandão, 2006).

A metodologia analítica proposta e validada foi desenvolvida a partir de pesquisas, tendo-se como destaque o trabalho desenvolvido por Sreevidya e Mehrotra (2003).

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado (Robusterina®, tintura de berberis, tintura de viburno e tintura de algodoeiro) foi gentilmente cedido pelo Laboratório Diniz & Brandão.

Material

Utilizaram-se vidrarias certificadas por lote, do fabricante Thermex®, espectrofotômetro Varian Modelo 6345, balança analítica Mettler Modelo AE 260 e centrífuga Fanem Modelo Série 204N/116653.

A substância química de referência (S.Q.R) determinada para a validação da metodologia analítica foi o sulfato de berberina, Merck®. No experimento foram manuseadas as seguintes substâncias: ácido clorídrico diluído (HCl 1N); Reagente de Dragendorff; nitrato de bismuto pentahidratado, (VETEC); iodeto de potássio (Mallinckrodt); água destilada; ácido acético glacial; álcool etílico absoluto (J.T. Baker); álcool etílico absoluto (Nuclear); sulfato de sódio (Merck®); ácido nítrico concentrado; tiouréia (Merck®); Robusterina® (Laboratório Diniz & Brandão, Lote 0405033 validade 05/2007).

Preparação da solução de sulfato de berberina S.Q.R.

Foram pesados 61,3 mg de sulfato de berberina (S.Q.R) (equivalente a 50 mg de berberina) e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada, e, em seguida transferiu-se 5 mL de cada solução (triplicata) e acidificou-se a pH entre 2-2,5 com HCl 1N; transferiu-se 5 mL da solução acidificada para cada tubo de centrífuga (triplicata) e a cada tubo foram adicionados 2 mL do Reagente de Dragendorff e centrifugou-se a 2400 rpm/ 30 minutos; desprezou-se o sobrenadante e tratou-se

o resíduo com 1 mL de álcool etílico absoluto; foram adicionados 2 mL de sulfato de sódio a 1% e centrifugou-se a 2400 rpm / 30 minutos e a seguir desprezou-se o sobrenadante e tratou-se o resíduo com 2 mL de ácido nítrico concentrado; transferiu-se o conteúdo resultante para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com água destilada; foi tomado 1 mL desta solução e adicionou-se 5 mL de tiouréia a 3% (p/V); a mistura de ácido nítrico e tiouréia foi usada como branco; para a amostra foi procedida a leitura a 435 nm.

A linearidade foi obtida entre 40,0 e 200,0 µg/mL.

Preparação da amostra

Foram tomados 40 mL do produto (que corresponde a uma concentração 6,66 mg/mL* de *Berberis vulgaris* na Robusterina®) e acidificou-se a pH entre 2-2,5 com HCl 1N; distribuiu-se este volume em 4 tubos de centrifuga; a cada tubo adicionou-se 4 mL do Reagente de Dragendorff e foram centrifugados a 2400 rpm / 30 minutos; prosseguiu-se conforme descrito na solução de sulfato de berberina S.Q.R e as amostras

foram lidas em espectrofotômetro a 435 nm, utilizando a mistura de ácido nítrico e tiouréia como branco, de acordo com o descrito por Sreevidya e Mehrotra (2003).

*A concentração de 6,66 mg/mL é resultante da produção da Robusterina®, onde é adicionado 1 kg de material vegetal (casca de raiz) de *Berberis vulgaris* para um volume final de 150 L do produto.

Estudo da validação

Os parâmetros avaliados foram a robustez, linearidade, especificidade, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão.

Robustez: A robustez do método foi determinada sobre as variações de pH, velocidade de centrifugação e marca de solvente. As análises foram realizadas em quadruplicata com as amostras reais do fitoterápico Robusterina®. A sua avaliação foi feita através da análise de variância (ANOVA) one-way.

Linearidade: A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas, usando-se seis concentrações (40,

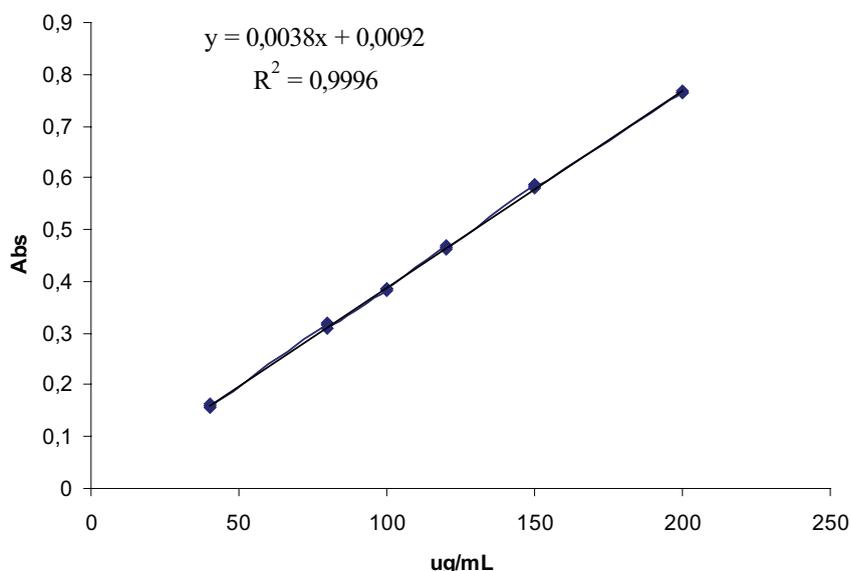


Figura 1. Curva de regressão linear obtida da média das três curvas de calibração autênticas

Tabela 1. Resultados da linearidade - 3 curvas autênticas do sulfato de berberina

Concentração µg/mL/sulfato de berberina	Média/Absorvâncias	CV %
40	0,1600	2,50
80	0,3147	1,32
100	0,3843	0,79
120	0,4653	0,75
150	0,5827	0,60
200	0,7650	0,26

Tabela 2. Resultados da análise de variância para linearidade

Fonte	SQ	gl	MQ	F	F-crítico
Modelo SQ reg	0,670816935	1	0,670816935	36130,33	4,4940
Residual SQ res	0,000297065	16	1,85666E-05	Curva Linear*	
Falta de ajuste SQ faj	0,000154399	4	3,85997E-05	3,24	3,25
Erro puro SQ erp	0,000142667	12	1,18889E-05	Não há falta de ajuste**	
Total SQ tot	0,671114	17	0,039477294		

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

* Regressão Estatisticamente Significativa

** Proporcionando uma curva linear

Tabela 3. Avaliação da robustez variando o parâmetro de pH

pH	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
2,3	29,20	29,20	29,20	28,32
2,4	28,48	29,00	29,20	28,84
2,5	28,68	29,00	28,68	28,32
Média	28,79	29,07	29,03	28,49
Desv Pad	0,3717	0,1155	0,3002	0,3002
CV(%)	1,2911	0,3973	1,0343	1,0537

Tabela 4. Avaliação da robustez variando o pH de acordo com a ANOVA.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,20	2	0,10	0,826	0,468	4,256
Dentro dos grupos	1,09	9	0,12			
Total	1,29	11				

Tabela 5. Avaliação de robustez variando o parâmetro de velocidade de centrifugação.

VC* (rpm)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
2000	29,90	29,90	30,04	29,90
2200	30,04	30,02	29,90	29,90
2400	29,90	29,82	29,90	29,90
Média	29,95	29,91	29,95	29,90
Desv Pad	0,0808	0,1007	0,0808	0,000
CV(%)	0,2699	0,3365	0,2699	0,000

* Velocidade de Centrifugação

Tabela 6. Avaliação da robustez variando a velocidade de centrifugação de acordo com a ANOVA.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,01	2	0,005	1,827	0,215	4,256
Dentro dos grupos	0,04	9	0,004			
Total	0,05	11				

80, 100, 120, 150 e 200 µg/mL). Para verificação da significância da equação de regressão, foram efetuados testes de ajuste do modelo linear e validade da regressão. Para determinação da linearidade foi utilizado o sulfato de berberina S.Q.R.

Especificidade: Foi realizada uma mistura das tinturas de algodoeiro e de viburno e procedeu-se conforme descrito para S.Q.R. A mistura funcionou como placebo para provar a ausência de alcalóides nestas duas plantas (*Gossypium herbaceum* e *Viburnum opulus*).

Precisão: A repetibilidade foi determinada pela análise de seis amostras individuais do fitoterápico Robusterina®. A precisão intermediária foi determinada em dois dias por dois analistas diferentes, utilizando também amostras da Robusterina®.

A repetibilidade foi expressa através do coeficiente de variação (CV) e a precisão intermediária foi expressa, além do CV, através do intervalo de confiança da média pelo teste t de Student (Ribani et al., 2004).

Limite de detecção (LD): É calculado também na prática como uma concentração que produz um sinal três vezes maior que o nível de ruído médio medido com o branco ou solução controle (Leite, 1989).

$$LD = \frac{3 DP}{\alpha}$$

DP = Desvio Padrão Médio da menor concentração

α = Médias dos coeficientes angulares

Limite de Quantificação (LQ): Para se realizar o LD e LQ foi considerada o desvio padrão da reta com relação à absorvância do primeiro nível de concentração (40 µg/mL) do sulfato de berberina nas três curvas de calibração e seus coeficiente angulares (inclinação da reta). Foi considerada a razão de três vezes da linha da base para o LD e dez vezes para o LQ.

$$LQ = \frac{10 DP}{\alpha}$$

DP = Desvio Padrão Médio da menor concentração

α = Médias dos coeficientes angulares

Exatidão: A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração: 50, 100 e 150%, onde 100% correspondeu a concentração de 29,46 µg/mL, determinada a partir da média da análise de seis amostras de Robusterina® no parâmetro da repetibilidade. Antes de obter a exatidão do método foi determinada uma aplicação do método de adição do padrão (sulfato de berberina), para que obtivéssemos um valor nominal na amostra real do fitoterápico Robusterina®. Após detecção do aumento do sinal do analito provocado pela adição do padrão, por diferença foi obtida a concentração de analito originalmente presente no volume da matriz. Após certificação deste processo, foram preparadas as amostras do fitoterápico Robusterina®, conforme descrito para a preparação da S.Q.R. sendo que, para a quantidade de 50%, tomou-se o volume de 0,5 mL, para 100%, volume de 1,0 mL e para 150%, um volume de 1,5 mL, que foram adicionados com 5 mL de tiouréia e lidos em

espectrofotômetro a 435nm.

Os testes foram feitos em triplicata de cada nível de concentração e foram avaliados através do teste t de Student, comparando-se os resultados em relação ao valor teórico definido para cada concentração analisada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi feita uma varredura espectrofotométrica com o sulfato de berberina, na concentração de 100 µg/mL, para determinar o comprimento de onda de 435 nm, de acordo com Sreevidya e Mehrotra (2003). A partir desta observação, iniciou-se a determinação da curva de calibração tomando os dados descritos na Tabela 1.

Linearidade

Os resultados foram plotados e está representado em gráfico na figura 1, tendo no eixo dos x a concentração de sulfato de berberina e no eixo dos y absorvância. Pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta $y = 0,0038x + 0,0092$. A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9996$ valor que comprova a linearidade do método (Figura 1).

A partir da análise de variância (Tabela 2) podemos testar a validação do modelo e a significância estatística da curva ajustada. As análises de variância dos dados demonstraram que o método é linear, na faixa de concentração testada (40-200 µg/mL) e que não há falta de ajuste do modelo, já que esta relação apresentou um valor de $F_{\text{calculado}} = 3,24$, abaixo do valor crítico $F_{\text{tabelado}} = 3,25$ com 4 e 12 graus de liberdade e 95% de confiança mostrando que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada (Pimentel; Barros, 1996).

Robustez

Foram analisadas amostras em quadruplicata para cada parâmetro de variação estudado: alteração de pH (2,3; 2,4 e 2,5), velocidade de rotação (2000, 2200 e 2400 rpm) e marca do solvente (álcool etílico absoluto).

Avaliação da robustez variando o pH

A Tabela 3, mostra a avaliação da robustez, variando o parâmetro de pH.

Para o parâmetro avaliado (pH), verificou-se estatisticamente através do ANOVA (análise de variância) que não há diferença significativa entre os resultados. Obtendo-se um $F_{\text{calculado}} = 0,826$ menor que o $F_{\text{tabelado}} = 4,256$, o método apresenta-se robusto, não existindo, em um nível de 95% de confiança, variação estatisticamente significativa quanto ao pH (Tabela 4).

Avaliação da robustez variando a velocidade de centrifugação

Tabela 7. Avaliação da robustez variando o parâmetro Marca do Solvente.

Marca do Solvente	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Nuclear	29,36	29,52	29,74	29,74
J. T. Backer	29,00	29,20	29,20	29,90
Média	29,18	29,36	29,47	29,82
CV(%)	0,8724	0,7707	1,2957	0,3794

Tabela 8. Teste-t - robustez de marca do solvente.

	Nuclear	J. T. Backer
Média	0,0342	29,32
Variância	1,2156	0,1558
Stat t	1,2156	
P(T<=t) bi-caudal	0,2698	
T crítico bi-caudal	2,4469	

Tabela 9. Resultados da repetibilidade.

Amostra/Média	µg / mL	Concentração %
Média	29,46	0,4420
Desv Pad	0,5147	0,0077
CV%	1,7468	1,7468

Tabela 10. Resultados da precisão intermediária, de 4 amostras tratadas em dias consecutivos e analistas distintos

Dias/Analistas	Amostra-1	Amostra-2	Amostra-3	Amostra-4
Média	28,19	28,58	28,71	28,45
Desv Pad	0,9940	0,5200	0,2600	0,6609
CV%	3,5268	1,8195	0,9056	2,3237

Tabela 11. Precisão Intermediária de acordo com a ANOVA.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado
Analistas	0,60	3	0,20	0,38	3,86
Dias	0,47	3	0,16	0,29	3,86
Erro	4,82	9	0,53		
Total	5,89	15			

Tabela 12. Resultados da Exatidão para concentrações baixa, média e alta.

Determinações	13,50 µg/mL	29,46 µg/mL	45,47 µg/mL
Média	13,75	29,28	45,41
Desv Pad	0,1791	0,1064	0,2127
CV (%)	1,3023	0,3632	0,4684

Tabela 13. Teste t de Student para exatidão – Concentrações baixa (50%), média (100%)e alta (150%).

Percentual	T calculado	T tabelado
50%	2,4173	
100%	2,9314	4,3030
150%	0,4885	

A Tabela 5 mostra os resultados da robustez variando o parâmetro de velocidade de centrifugação.

Para o parâmetro avaliado (velocidade de centrifugação), verificou-se estatisticamente através do ANOVA (análise de variância) que não há diferença significativa entre os resultados. Obtendo-se um $F_{\text{calculado}} = 1,827$ menor que o $F_{\text{tabelado}} = 4,256$, o método apresenta-se robusto, não existindo, em um nível de 95% de confiança, variação estatisticamente significativa quanto à velocidade de centrifugação (Tabela 6).

Avaliação da robustez variando a marca do solvente

O álcool etílico é utilizado para lavar o resíduo antes de se adicionar o sulfato de sódio, conforme descrito para a preparação da S.Q.R. sulfato de berberina e amostra.

Os resultados estão na Tabela 7.

Para a avaliação da robustez variando a marca do solvente álcool etílico absoluto, utilizou-se o teste t de Student como ferramenta estatística para comparar as médias entre eles. Sendo o $T_{\text{calculado}} (1,2156)$ menor que o $T_{\text{tabelado}} (2,4469)$ não há diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança entre a média da concentração do solvente álcool etílico absoluto da marca Nuclear e o da marca J.T. Backer. Os resultados afirmam que o método é robusto para o parâmetro estudado (Tabela 8).

Repetibilidade

A Tabela 9 explicita os resultados do ensaio de repetibilidade.

Observando-se os resultados, podemos concluir que o método tem uma boa repetibilidade, visto que o coeficiente de variação (CV%) é inferior ao especificado pela resolução vigente, que é de 5 %.

Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada em diferentes dias e com diferentes analistas, utilizando a mesma concentração. A Tabela 10 mostra os resultados da precisão intermediária, entre dias e analistas.

O estudo da precisão do método entre ensaios demonstrou que não há grandes diferenças entre as amostras analisadas individualmente em pequeno intervalo de tempo, assim como a precisão entre dias e entre analistas e os resultados encontrados demonstram que estas se enquadram dentro dos limites especificados. Na análise de variância o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o F_{tabelado} não havendo diferença estatisticamente significativa em um nível de 95% de confiança entre os dois analistas (Tabela 11).

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

A partir do momento que se define que o método é linear, podem ser calculados os valores de LD e LQ, utilizando a média do desvio padrão (DP) do primeiro ponto da reta e coeficientes angulares (ic). O LD calculado foi de 3,1578 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de 10,5263 $\mu\text{g/mL}$.

Especificidade

Foi preparada uma mistura com as tinturas de algodoeiro e de viburno na proporção 1:1, que também fazem parte da tintura de Robusterina, e que não apresentam alcalóides. A análise foi determinada em quadruplicata, para testar a especificidade do método para alcalóides. O método mostrou-se específico para alcalóides, pois as leituras de absorvância foram próximas a zero.

Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada no mesmo dia com três concentrações diferentes baixa, média e alta (50% (13,50 $\mu\text{g/mL}$); 100% (29,46 $\mu\text{g/mL}$); 150% (45,47 $\mu\text{g/mL}$)).

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes (50%, 100%, 150%) e o percentual de recuperação nas três concentrações analisadas encontrou-se dentro dos limites como mostram os resultados da Tabela 12.

O estudo estatístico aplicado foi o t de Student o qual demonstrou que o $T_{\text{calculado}}$ foi menor que o T_{tabelado} comprovando que não houve diferença significativa entre as médias das três concentrações analisadas com um intervalo de 95% de confiança (Tabela 13).

Conforme dito anteriormente, o trabalho executado por Sreevidya e Mehrotra (2003), foi de grande valia para o artigo, pois a metodologia sugerida por eles nos forneceu base suficiente para desenvolver e validar uma metodologia analítica para o produto Robusterina®. Em tal artigo os autores utilizaram a *Berberis aristata* e outras plantas (*Solanum nigrum* e *Piper longum*) que apresentam alcalóides para mostrar que o método responde no que diz respeito de doseamento de alcalóides. Como a Robusterina® apresenta casca de raiz de *Berberis vulgaris* L., proporcionou-se a oportunidade de dosear alcalóides totais (como berberina), no produto, trazendo um subsídio de controle de qualidade para a empresa fornecedora, para apresentar para os órgãos reguladores (ANVISA). Este método pode ser aplicado numa análise de rotina de uma indústria de medicamentos fitoterápicos pela sua facilidade de execução.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pela concessão bolsa de estudo ao primeiro autor, ao Laboratório Diniz & Brandão (em nome da Farmacêutica Adelaide Tavares) pelo fornecimento das tinturas e da Robusterina® para o desenvolvimento do trabalho, para a coordenadora

do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos profa. Miracy e sua equipe e para o prof. Haroudo Satiro Xavier do Laboratório de Farmacognosia.

REFERÊNCIAS

- Alonso JR 1998. *Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Isis Ediciones SRL, p.175-176.
- ANVISA 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 02/06/2003.
- ANVISA 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC N°48, de 16 de Março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 18/03/2004.
- Bara MTF, Ribeiro PAM, Arantes MCB, Amorim LLSS, Paula JR 2006. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Rev Bras Farmacogn* 16: 211-215.
- Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Lima KVB, Cunha EVL, Fechine IM, Takemura OS 2006a. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Rev Bras Farmacogn* 16: 109-139.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ 2006b. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 16: 258-285.
- Barros CB 2002. Validação de métodos analíticos. *Biológico* 64: 175-177.
- Bruneton J 1991. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA.
- Cunha AP, Silva AP, Roque OR 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Duke JA 1985. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. Florida: CRC Press, Inc, p. 78.
- Farnsworth N 1975. Potential value of plants as sources of a new antifertility agents. *J Pharm Sci* 64: 535-593.
- Fernald ML, Kinsey AC, Rollins RC 1958. *Edible wilds plants of Eastern North America*. New York: Harper and Brothers.
- <http://www.fredmeyer.com/Es-Herb/Barberry.htm>, acessada em junho de 2005.
- Leite F 1989. *Validação em Análise Química*. 3 Ed. São Paulo: Editora Átomo.
- Martins ELP, Brandão MGL 2006. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (Castanha-da-Índia). *Rev Bras Farmacogn* 16: 224-229.
- PDR for Herbal Medicines 2000. Montvale, New Jersey: Medical Economics Company.
- Pimentel MF, Barros NB 1996. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quim Nova* 19: 268-277.
- Pizzorno JE, Murray MT 1985. *A Textbook of Natural Medicine*. Seattle, Washington: John Bastyr College Publications.
- Preininger V 1975. The Pharmacology and Toxicology of the Papaveraceae alkaloids. In: Manske RHF, Holmes HL. *The alkaloids*. V. 15. New York: Academic Press, p. 239.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 27: 771-780.
- Ribeiro AQ, Leite JPV, Dantas-Barros AM 2005. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev Bras Farmacogn* 15: 65-70.
- Sreevidya N, Mehrotra S 2003. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J AOAC Int* 86: 1124-1127.