

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA ENSAIOS DE PUREZA NO  
CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS DE ORIGEM  
VEGETAL**

**DAIANI DE BEM BORGES**

**FLORIANÓPOLIS**

**2005**

**DAIANI DE BEM BORGES**

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA ENSAIOS DE PUREZA NO  
CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS DE ORIGEM  
VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Co-orientadora: Profa. Dra. Mareni Rocha  
Farias

**FLORIANÓPOLIS**

**2005**

*Dedico este trabalho a meus pais JOÃO  
GREGÓRIO MARCOS BORGES e VALDETE  
DE BEM BORGES, pelo incentivo,  
compreensão e amor incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Eloir Paulo Schenkel pela orientação, pelo exemplo de postura científica, pela confiança em meu trabalho e pela liberdade, que tornaram meu aprendizado mais desafiante e prazeroso e pelo incentivo.

À Professora Dra. Marení Rocha Farias pela co-orientação neste trabalho, por ter acreditado na minha capacidade desde o início e por ter me dado a oportunidade de começar, pelo apoio, pelo incentivo e pela amizade.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC que, de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial a professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões e a professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg, pelas críticas e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao Professor Dr. Afonso Inácio Orth, do Laboratório de Entomologia, do Departamento de Fitotecnia da UFSC, pela disponibilidade e colaboração na contagem e identificação dos fragmentos de insetos isolados na determinação de sujidades leves em matérias-primas vegetais.

À Professora Dra. Lílian Auler Mentz, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela constante disponibilidade e colaboração na identificação das matérias-primas vegetais.

Ao Professor Dr. Pedro Eduardo Fröhlich, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela pronta disposição para a realização da determinação de metais pesados a partir dos resíduos de cinzas.

Às farmacêuticas e técnicas do Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina (LAFESC), em especial as farmacêuticas Inês Stoffel, pela colaboração na realização da pesquisa da contaminação microbiológica e a Liemar Coelho Vieira, pela amizade.

À Patrícia Krepsk, pela amizade, pelo incansável auxílio nas discussões sobre as metodologias empregadas em todas as etapas deste trabalho, assim como pelas críticas e sugestões.

A todos os colegas e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e que tornaram mais agradável este período da minha vida: Andressa, Carine, Cíntia, Cláudia, Eliziane, Francisco, Leandro, Mariliz, Melissa, Pablo, Roberto, Rodrigo, Sandra, Silvana, Solange, Teca.

*Daiani.*

*Ao chegar à borda da floresta, o riacho  
vem maior, quase um rio. Adulto, já não corre, salta  
borbulha como fazia quando jovem.*

*Agora, move-se com tranqüilidade de  
quem sabe para onde vai.*

*Diz: “Não há pressa. Chegarei lá”.*

*Princípios do Wu-Wei.*



## RESUMO

Este trabalho refere-se ao desenvolvimento e a otimização de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle da qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal; o estabelecimento de parâmetros de qualidade, assim como a padronização e análise da aplicabilidade das metodologias testadas. Para tanto, foram empregadas as seguintes matérias-primas vegetais: *Achyrocline satureioides*, *Calendula officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata*. Quanto às metodologias analíticas para ensaio de pureza trabalhou-se com a caracterização do material vegetal por cromatografia em camada delgada; a determinação de materiais estranhos e de sujidades leves em matérias-primas vegetais, juntamente com a pesquisa da contaminação microbiológica; a determinação de água em matérias-primas vegetais e a validação da determinação de água em analisador de umidade; a determinação de cinzas totais, cinzas sulfatadas e a determinação de metais pesados a partir dos resíduos de cinzas obtidos. Entre os resultados obtidos, verificou-se a adequação da cromatografia em camada delgada para a caracterização das matérias-primas vegetais analisadas. Na determinação de materiais estranhos em matérias-primas vegetais os percentuais encontrados nas matérias-primas vegetais analisadas foram maiores do que o especificado nas respectivas monografias em duas das quatro matérias-primas analisadas. Técnicas microanalíticas utilizadas na área de alimentos, para a determinação de sujidades leves mostraram-se passíveis de aplicação no controle de qualidade de matérias-primas vegetais. Na pesquisa da contaminação microbiológica, os níveis observados para a matéria-prima vegetal maracujá estavam acima do limite aceitável para o consumo na forma de infusões. Na determinação de água não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as metodologias “Determinação de água em drogas vegetais” (FARMACOÉIA BRASILEIRA, 2000) e a “Perda por dessecação” (FARMACOÉIA BRASILEIRA, 1988) para as matérias-primas vegetais analisadas que não contêm óleos voláteis. Quanto à determinação de água em analisador de umidade não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos resultados obtidos através do método de referência (Perda por Dessecação), além disso, os resultados obtidos mostraram-se exatos e precisos para as matérias-primas vegetais analisadas. Na determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas observou-se que os teores de cinzas, assim como a composição do resíduo de incineração, apresentaram variações de acordo com a temperatura e o tempo de incineração empregado e que o teor de cinzas sulfatadas é cerca de 50% superior ao obtido através da determinação de cinzas totais. De acordo com os resultados obtidos através da determinação de metais pesados a partir dos resíduos de cinzas totais verificou-se que a 800°C ocorre um aumento substancial nos valores encontrados, o qual pode estar relacionado com a volatilização ou com a decomposição de constituintes inorgânicos presentes nas amostras. Quanto à determinação de metais pesados a partir dos resíduos de cinzas sulfatadas, não foram verificadas tendências claras.

**Palavras-chave:** matérias-primas vegetais; controle de qualidade; otimização e padronização de metodologias analíticas; ensaios de pureza.





## ABSTRACT

This work refers to the development and optimization of analytic methodologies for purity tests in the quality control of plant raw materials, the establishment of quality parameters, as well as the standardization and analysis of the applicability of the tested methodologies. The following plant raw materials were used: *Achyrocline satureioides*, *Calendula officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Maytenus ilicifolia* and *Passiflora alata*. For the purity tests, the following methodologies have been employed: thin layer chromatography; determination of foreign matter and of light filth in plant raw materials, and microbiological analysis (total viable aerobic count, yeasts and moulds count, detection of Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). The methodology of water determination by infrared drying was compared with the Brazilian pharmacopeial methodologies for water determination in plant raw materials and validated. The determination of ashes (total ash and sulphated ash) and the determination of heavy metals in the residues of ignition were realized too. According our results, the thin layer chromatography is appropriate for the characterization of the analyzed vegetable raw materials. In the determination of foreign matters in plant raw materials, the percentage found in the samples analyzed was larger than specified in the respective monographs in two of the four analyzed raw materials. The determination of light filth through micro-analytical techniques usually employed in food analysis was showed to be applicable in the quality control of plant raw materials. The levels of contamination microbiological observed in the samples of passion flower were above the acceptable limit for the consumption in the shape of teas or infusions. In the determination of water no significant statistical difference was observed between the two gravimetric methodologies for the analyzed vegetable raw materials that don't contain volatile oils. After optimization of operating conditions, the results of water determination by infrared drying were not significantly different from those obtained using the loss on drying pharmaceutical method. No statistically significant difference was observed for repeatability, intermediate precision and reproducibility, demonstrating the accuracy and precision of the proposed methodology. In the determination of total ashes and sulphated ashes it was observed that the percentage of ashes, as well as the composition of the incineration residue, showed variations in agreement with the temperature and the time of incineration employed. The percentage of sulphated ashes was about 50% superior to the amount obtained through the determination of total ashes. At the determination of heavy metals in the residues of total ashes, it was verified a substantial increase in the values found at 800 °C, which can be related with the volatilization or decomposition of inorganic constituent present in the samples. With relationship to the determination of heavy metals starting from the residues of sulphated ashes, no clear tendencies were verified.

**Key Word:** plant raw materials; quality control; optimization and standardization of analytic methodologies; tests of purity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> <i>Calendula officinalis</i> .....	34
<b>Figura 2.2:</b> <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	36
<b>Figura 2.3:</b> <i>Foeniculum vulgare</i> .....	38
<b>Figura 2.4:</b> <i>Passiflora alata</i> .....	40
<b>Figura 2.5:</b> <i>Achyrocline Satureioides</i> .....	43
<b>Figura 3.1:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal calêndula ( <i>Calendula officinalis</i> ).....	56
<b>Figura 3.2:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal espinheira-santa ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ).....	58
<b>Figura 3.3:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal espinheira-santa ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ) com base nos constituintes triterpenóicos friedelina e friedelanol. ....	59
<b>Figura 3.4:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal funcho ( <i>Foeniculum vulgare</i> ).. ..	61
<b>Figura 3.5:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal maracujá ( <i>Passiflora alata</i> )..	64
<b>Figura 3.6:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal marcela ( <i>Achyrocline satureioides</i> ) - Sistema 1.. ..	65
<b>Figura 3.7:</b> Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal marcela ( <i>Achyrocline satureioides</i> ). Eluente 4. ....	68
<b>Figura 4.1:</b> Amostras das matérias-primas vegetais utilizadas para a determinação de materiais estranhos .....	76
<b>Figura 4.2:</b> Frasco armadilha de Wildman .....	79
<b>Figura 4.3:</b> Materiais estranhos encontrados nas amostras de espinheira-santa.....	90
<b>Figura 4.4:</b> Matérias estranhos encontrados nas amostras de calêndula.....	90
<b>Figura 4.5:</b> Matérias estranhos encontrados nas amostras de funcho.....	91
<b>Figura 4.6:</b> Matérias estranhos encontrados nas partes aéreas do maracujá. ....	92

<b>Figura 6.1:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais para a droga vegetal calêndula.....	131
<b>Figura 6.2:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal calêndula.....	132
<b>Figura 6.3:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal espinheira-santa.....	134
<b>Figura 6.4:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal espinheira-santa.....	135
<b>Figura 6.5:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal funcho .....	137
<b>Figura 6.6:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal funcho .....	137
<b>Figura 6.7:</b> Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal marcela. ....	139
<b>Figura 6.8:</b> Coloração dos resíduos de cinzas obtidos na deteminação de cinzas totais e sulfatadas, para calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela .....	142
<b>Figura 6.9:</b> Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula. ....	146
<b>Figura 6.10:</b> Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal funcho.....	146
<b>Figura 6.11:</b> Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa .....	147
<b>Figura 6.12:</b> Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal marcela.....	147
<b>Figura 6.13:</b> Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula .....	149

<b>Figura 6.14:</b> Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa .....	149
<b>Figura 6.15:</b> Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal funcho.....	150
<b>Figura 6.16:</b> Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal marcela.....	150

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal calêndula.....	50
<b>Tabela 3.2:</b> Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal espinheira-santa.....	51
<b>Tabela 3.3:</b> Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal funcho .....	52
<b>Tabela 3.4:</b> Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal maracujá .....	53
<b>Tabela 3.5:</b> Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal marcela .....	54
<b>Tabela 4.1:</b> Alterações nas metodologias para a determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.....	82
<b>Tabela 4.2:</b> Percentuais de materiais estranhos encontrados nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	89
<b>Tabela 4.3:</b> Padronização das metodologias para determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.....	94
<b>Tabela 4.4:</b> Somatório dos tipos e quantidades de sujidades leves isoladas nas matérias-primas vegetais calêndula (A), espinheira-santa (B), funcho (C) e maracujá (D) .....	95
<b>Tabela 4.5:</b> Resultados da análise microbiológica das matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela.....	96
<b>Tabela 5.1:</b> Teores de água obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação de água por destilação azeotrópica” e “Determinação da perda por dessecação”, nas drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	108



<b>Tabela 5.2:</b> Tempo total de análise necessário para a realização das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação de água por destilação azeotrópica” e “Determinação da Perda por dessecação” nas drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	110
<b>Tabela 5.3:</b> Teores de água obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais” e “Determinação da perda por dessecação”, para as drogas vegetais vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	111
<b>Tabela 5.4:</b> Teores de água observadas através da metodologia “Determinação da perda por dessecação”, após duas pesagens consecutivas, nas drogas vegetais vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	112
<b>Tabela 5.5:</b> Determinação de água em analisador de umidade, para as matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.....	114
<b>Tabela 5.6:</b> Comparação entre os teores de água obtidos através da “Determinação da perda por dessecação”, e da “Determinação de água em analisador de umidade”, para as drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. ....	115
<b>Tabela 5.7:</b> Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, para as matéria-prima vegetal calêndula. ....	116
<b>Tabela 5.8:</b> Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, para a matéria-prima vegetal espinheira-santa.....	117
<b>Tabela 5.9:</b> Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, para as matéria-prima vegetal funcho....	118
<b>Tabela 5.10:</b> Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão	





intemediária e reprodutibilidade, para as matéria-prima vegetal maracujá.  
..... 119

**Tabela 6.1:** Parâmetros de análise empregados para a determinações de cinzas nas  
matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela.  
..... 127

**Tabela 6.2:** Teores de cinzas, para a droga vegetal calêndula, obtidos através da  
determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas  
sulfatadas (CS)..... 130

**Tabela 6.3:** Teores de cinzas, para a droga vegetal espinheira-santa, obtidos através  
da determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas  
sulfatadas (CS)..... 133

**Tabela 6.4:** Teores de cinzas, para a droga vegetal funcho, obtidos através da  
determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas  
sulfatadas (CS)..... 136

**Tabela 6.5:** Teores de cinzas, para a droga vegetal marcela, obtidos através da  
determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas  
sulfatadas (CS)..... 138

**Tabela 6.6:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e  
teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb,  
obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula ..... 144

**Tabela 6.7:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e  
teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb,  
obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa ..... 144

**Tabela 6.8:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e  
teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb,  
obtidos para a matéria-prima vegetal funcho..... 145

**Tabela 6.9:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e  
teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb,  
obtidos para a matéria-prima vegetal marcela..... 145



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 2 DADOS SOBRE AS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS ANALISADAS.....</b>	<b>34</b>
2.1 CALÊNDULA ( <i>Calendula officinalis</i> L.).....	34
2.2 ESPINHEIRA-SANTA ( <i>Maytenus ilicifolia</i> Martius ex. Reissek) .....	36
2.3 FUNCHO ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. Ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i> ) .....	38
2.4 MARACUJÁ ( <i>Passiflora alata</i> Curtis) .....	40
2.5 MARCELA ( <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC).....	43
<b>CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA..</b>	<b>45</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	45
3.2 OBJETIVOS.....	47
3.3 MATERIAIS .....	48
3.3.1 Material vegetal .....	48
3.3.2 Reagentes, soluções e substâncias reagentes.....	48
3.4 MÉTODOS.....	49
3.4.1 Preparação dos extratos .....	49
3.4.2 Análise cromatográfica e identificação das substâncias marcadoras.....	49
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	55
3.5.1 Calêndula .....	55
3.5.2 Espinheira-santa .....	57
3.5.3 Funcho .....	60
3.5.4 Maracujá .....	62
3.5.5 Marcela .....	65
<b>CAPÍTULO 4 MATERIAIS ESTRANHOS x CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA .....</b>	<b>70</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	70
4.2 OBJETIVOS.....	75
4.3 MATERIAIS .....	76

4.3.1	Material Vegetal .....	76
4.3.2	Aparelhos e equipamentos .....	77
4.3.3	Reagentes, solventes e soluções .....	77
4.4	MÉTODOS.....	78
4.4.1	Determinação de materiais estranhos .....	78
4.4.2	Pesquisa de sujidades leves (AOAC, 2000) .....	78
4.4.2.1	Método oficial da AOAC 975.48b.....	79
4.4.2.2	Método oficial da AOAC 981.18 .....	80
4.4.3	Pesquisa da contaminação microbiológica.....	83
4.4.3.1	Material vegetal.....	83
4.4.3.2	Determinação do número de microrganismos viáveis .....	84
4.4.4	Pesquisa de patógenos específicos .....	85
4.4.4.1	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella ssp</i> .....	85
4.4.4.2	Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .....	86
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
4.5.1	Determinação de materiais estranhos .....	88
4.5.2	Determinação de sujidades leves.....	92
4.5.3	Determinação de microrganismos viáveis totais e patógenos específicos.....	95
<b>CAPÍTULO 5 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EM MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS .....</b>		<b>99</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	99
5.2	OBJETIVOS.....	101
5.3	MATERIAIS .....	102
5.3.1	Material vegetal.....	102
5.3.2	Equipamentos .....	102
5.3.3	Reagentes, soluções e substâncias reagentes.....	102
5.4	MÉTODOS.....	103
5.4.1	Determinação de água em drogas vegetais .....	103

5.4.2	Determinação da perda por dessecação .....	103
5.4.3	Determinação de água por destilação azeotrópica .....	104
5.4.4	Determinação de água através de analisador de umidade .....	104
5.4.5	Validação da metodologia de determinação de água em analisador de umidade.....	105
5.4.5.1	Exatidão .....	105
5.4.5.2	Precisão .....	106
5.4.6	Análise estatística .....	107
5.5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>108</b>
5.5.1	Determinação de água segundo metodologias farmacopéicas.....	108
5.5.2	Determinação de água através de analisador de umidade .....	113
5.5.3	Validação da metodologia de determinação de água em analisador de umidade.....	114
	<b>CAPÍTULO 6 DETERMINAÇÃO DE CINZAS .....</b>	<b>120</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	120
6.2	OBJETIVOS.....	124
6.3	MATERIAS .....	125
6.3.1	Material vegetal .....	125
6.3.2	Aparelhos e Equipamentos.....	125
6.3.3	Reagentes, soluções e substâncias reagentes.....	125
6.4	MÉTODOS.....	126
6.4.1	Determinação de Cinzas totais .....	126
6.4.2	Determinação de Cinzas sulfatadas .....	126
6.4.2.1	Parâmetros analisados.....	127
6.4.3	Determinação de metais pesados .....	128
6.4.4	Análise estatística .....	128
6.5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>129</b>
6.5.1	Determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas.....	129

6.5.2	Determinação de metais pesados .....	143
<b>CAPÍTULO 7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>152</b>
<b>CAPÍTULO 8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>154</b>

## 1 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Plantas medicinais constituem uma das formas mais antigas de cuidar da saúde empregada pela humanidade. Até o começo do século XIX, o conhecimento destes recursos era de cunho empírico e o seu uso se restringia às formas de pós, extratos simples ou tinturas. Nessa mesma época teve início uma nova fase na história da medicina, caracterizada pelo isolamento e identificação química de compostos farmacologicamente ativos a partir de drogas vegetais (SAMUELSSON, 1992; ZHANG, 1998; MEMORY, 2001; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004).

Durante o século XX, o avanço na área científica e principalmente da indústria farmacêutica fez com que o número de medicamentos aumentasse significativamente. Os novos fármacos trouxeram benefícios significativos, no entanto, com a promessa de cura ou alívio imediato dos sintomas, passou-se a observar freqüentemente, a utilização abusiva deste recurso e, apesar do grande desenvolvimento da indústria farmacêutica, ainda há um grande número de doenças para as quais a terapia medicamentosa convencional é ineficaz e apresenta efeitos iatrogênicos importantes.

Com o decorrer do tempo e com o registro de efeitos adversos graves causados pelos medicamentos, teve início um novo período, caracterizado por uma maior cautela e, conseqüentemente, um maior rigor na regulamentação de novos produtos. Paralelamente, como resultado disso, e com a modificação das condições de vida e costumes da população, observou-se uma retomada do uso de produtos naturais tanto no Brasil (SCHENKEL et al, 1985; CAPASSO et al, 2000; SIMÕES; SCHENKEL, 2001), como no exterior (BLUMENTAL-BARBY; BALCK, 1986; RATES, 2001). Assim, ao final do século XX, observou-se um aumento do interesse pela fitoterapia, tanto por parte da população em geral, quanto nos serviços de saúde e meio acadêmico.

No Brasil, a utilização de plantas medicinais teve origem na cultura de diversos grupos indígenas. Houve a influência da colonização européia, principalmente da portuguesa, e do negro africano durante esse processo (SIMÕES et al, 1998; GONÇALVES; MARTINS, 1998). No entanto, apesar da reconhecida

potencialidade da flora brasileira, que conta com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 500.000 (NODARI; GUERRA, 2004), somente um número relativamente pequeno de espécies foi efetivamente estudado para possibilitar sua aplicação médica com segurança.

Atualmente, a implantação do uso da fitoterapia vem sendo incentivada e ou adotada por várias organizações governamentais e não governamentais. Isto é reflexo, sobretudo, por procura de soluções para problemas como o alto preço de medicamentos e da busca por uma menor dependência externa, visto que a indústria farmacêutica e cosmética brasileira ainda necessita da importação de grande parte de seus insumos farmacêuticos (SCHENKEL et al, 2004).

A produção de fitoterápicos representa uma perspectiva importante para o desenvolvimento desse setor industrial, levando-se em conta a riqueza da biodiversidade existente no país. Entretanto, muitas empresas que atuam neste segmento operam com padrões de qualidade nem sempre satisfatórios (FARIAS et al, 1985; MARQUES, 1992; SIMÕES et al, 1995). As causas para isso encontram-se na falta de tecnologia apropriada, na dificuldade de obtenção de matéria-prima com qualidade desejada, desconhecimento ou inexistência de métodos de controle de qualidade, falta de pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica e de validação de processo e metodologias (FARIAS et al, 1985).

O processamento de matérias-primas vegetais com vistas a sua utilização na produção de medicamentos e cosméticos requer conhecimentos que vão além da cultura popular, exigindo pesquisas de metodologias analíticas, a padronização do controle de qualidade, produção adequada, bem como o planejamento para a garantia da qualidade (SCHENKEL et al, 2004).

A importância da matéria-prima vegetal utilizada na produção de um fitoterápico decorre da sua natureza, definível como uma complexa mistura de constituintes químicos, cujos níveis podem apresentar variações consideráveis, dependendo de fatores ambientais e/ou genéticos (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; FARIAS, 2004). Os obstáculos iniciam-se com a fixação das especificações destes insumos, que pressupõe do profissional farmacêutico sólidos conhecimentos nas áreas de botânica e fitoquímica (MENSSEN, 1979; SIMÕES;



SCHENKEL, 2001). Tais características devem ser plenamente conhecidas para que se exerça o máximo controle sobre elas, no intento de se obter um padrão de qualidade reproduzível (FARIAS, 2004).

Para agravar o problema, o uso, a comercialização e a oferta indiscriminada de plantas medicinais, e de formas derivadas das mesmas, principalmente nos grandes centros urbanos, têm se tornado um problema de saúde pública. Nesse sentido, vários documentos têm sido elaborados visando normatizar o uso de formas farmacêuticas obtidas a partir de plantas medicinais. O escopo dessas normas tem sido o aproveitamento das potencialidades terapêuticas de grande número de plantas, obedecendo a critérios de segurança, eficácia e qualidade (WHO, 1991; WHO, 1993; WHO, 1998; BRASIL, 2004).

No Brasil, dentro do contexto de garantia da qualidade e segurança, a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde (MS) vem elaborando requisitos legais para a regulamentação da utilização de matérias-primas vegetais e de produtos fitoterápicos desde a criação da Portaria SVS n° 6, de 31/01/1995. Essa legislação exerceu um papel educativo importante e foi reformulada, mantendo suas características essenciais (Resolução RDC n° 17 de 24/02/2000). A necessidade de aprimoramento ocasionou na publicação da Resolução-RDC n° 48, de 16/03/2004, onde medicamento fitoterápico é definido como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais e caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

A eficácia de um medicamento é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos e de contaminantes nocivos à saúde, como, por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos metabólicos, produtos da degradação, entre outros (FARIAS, 2004).

A qualidade de um medicamento fitoterápico é assegurada através do somatório da qualidade dos insumos, das técnicas de produção empregadas (HALBACK, 1983 apud SOARES, 2001), juntamente com a utilização de metodologias analíticas validadas, que assegurem os requisitos pré-estabelecidos

para o controle da qualidade do produto final (FARIAS, 2004). Além disso, é necessário o estabelecimento de especificações para a padronização das matérias-primas vegetais e dos fitoterápicos produzidos, de modo a garantir a qualidade dos mesmos (MESSEN, 1979; HALBACK, 1983 apud SOARES, 2001; LIST; SCHMIDT, 1989). Esta necessidade constitui um desafio para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, pois, as metodologias validadas e relatadas são bastante escassas, principalmente no que concerne às plantas nativas do país. Além disso, diversos métodos farmacopéicos, quando analisados criteriosamente, têm demonstrado possuir caráter convencional, sem a solidez desejável (SCHMIDT; GONZÁLEZ-ORTEGA, 1993).

Quanto ao estabelecimento de especificações para padronização de matérias-primas vegetais devem ser levados em consideração: os dados sobre a matéria-prima vegetal (nome científico, nome popular, família, parte da planta utilizada, etc.), definição, descrição, identificação da matéria-prima, caracterização macro e microscópica, testes de pureza (incluindo materiais estranhos, metais pesados, cinzas, umidade, contaminação microbiológica), análises qualitativa e quantitativa de substâncias ativas ou constituintes característicos da espécie vegetal (marcadores) e estabilidade durante a estocagem (WHO, 1998; CHOI et al, 2002).

Tendo em vista as necessidades apresentadas no âmbito do presente trabalho, objetivou-se o desenvolvimento e a otimização de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle da qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal; o estabelecimento de parâmetros de qualidade, assim como a padronização e análise da aplicabilidade das metodologias testadas.

Para a realização das análises trabalhou-se com algumas das matérias-primas vegetais selecionadas para o desenvolvimento do projeto apoiado pelo Programa Plano Sul de Pós-Graduação e Pesquisa: *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. No entanto deve ficar claro, que este trabalho está centrado no desenvolvimento e na otimização de metodologias analíticas e não na análise das matérias-primas vegetais em si.

O presente trabalho está dividido em 6 capítulos, os quais têm seus objetivos específicos.

Capítulo 1 - Apresentação do trabalho

Capítulo 2 - Dados sobre as drogas vegetais analisadas: com vistas a subsidiar o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais.

Capítulo 3 - Caracterização por cromatografia em camada delgada: realizada com o intuito de comparar a aplicabilidade de diferentes sistemas cromatográficos com vistas a melhor caracterização do perfil cromatográfico para as drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho, maracujá e marcela.

Capítulo 4 - Análise de materiais estranhos x Contaminação microbiológica: visa avaliar se há correlação entre o teor de materiais estranhos, a determinação de sujidades leves e a contaminação microbiológica das drogas vegetais analisadas.

Capítulo 5 - Determinação de água em matérias-primas vegetais: busca comparar a aplicabilidade das metodologias farmacopéicas preconizadas para a determinação de água em drogas vegetais e validar a determinação de água em analisador de umidade.

Capítulo 6 - Determinação de cinzas: visa comparar as metodologias para determinação de cinzas preconizadas em diferentes farmacopéias, especificar a melhor temperatura e o tempo de incineração a ser empregada para a determinação de cinzas em matérias-primas vegetais.

Cabe ressaltar, que nos dois primeiros capítulos as cinco espécies selecionadas foram abordadas. No entanto, nos demais capítulos optou-se por trabalhar apenas com quatro espécies em virtude do número de análises a realizar e da quantidade de matéria-prima vegetal disponível.

## 2 DADOS SOBRE AS MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS ANALISADAS

### 2.1 CALÊNDULA

*Calendula officinalis* L. (Asteraceae) é uma espécie de origem europeia, amplamente utilizada em todo o mundo (Figura 2.1). Ela é cultivada com propósitos medicinais e ornamentais na Europa, leste da Ásia e nas Américas. No Brasil é conhecida popularmente como calêndula, mal-me-quer, maravilha, verrucária, mal-me-quer dos jardins, maravilha-dos-jardins (CRUZ, 1995).



**Figura 2.1:** *Calendula officinalis*

Fonte [www.ibiblio.org/.../calendula\\_officialis-11.htm](http://www.ibiblio.org/.../calendula_officialis-11.htm)

Atualmente, monografias da *Calendula officinalis* L. podem ser encontradas em várias farmacopéias, bem como na Farmacopéia Brasileira, (2001a). A parte da planta utilizada em preparações farmacêuticas e cosméticas são as flores secas, as quais são utilizadas na forma de uma infusão, tintura, extrato líquido, óleo de calêndula ou pomada (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; ESCOP, 1996; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINKMANN, 2000; ZHANG, 1999).

Tradicionalmente, o uso de preparações tópicas a base de *Calendula officinalis* é muito difundido em dermatologia e em cosméticos (DELLA LOGGIA et al, 1994), para o tratamento de várias afecções dermatológicas, como antiinflamatório, antipruriginoso, cicatrizante (BISSET, 1994; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; MILLS; BONE, 2000; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINKMANN, 2000; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004). Segundos os pesquisadores, estas atividades farmacológicas atribuídas a *Calendula officinalis* estão relacionadas com a presença de flavonóides e saponinas (ISSAC, 1992).

No que diz respeito à constituição química das flores de calêndula as saponinas triterpênicas e os flavonóides são os constituintes majoritários (VIDAL-OLLIVIER; BALANSARD, 1989; BISSET, 1994; ZHANG, 1999). As saponinas foram isoladas das raízes, folhas e flores, alcançando nestas últimas cerca de 6%. Suas

estruturas foram elucidadas como sendo mono e bidesmosídeos do ácido oleanólico com os açúcares glicose, galactose e ácido glicurônico (AKIHISA et al, 1996). Da fração solúvel em 1-butanol foram isolados quatro novos oligoglicosídeos triterpênicos (calendasaponinas A, B, C e D), dois novos glicosídeos de ionona (oficinosídeos A e B), além de dois novos sesquiterpenos glicosilados denominados oficinosídeos C e D (YOSHIKAWA et al, 2001). Também foi descrita a presença de álcoois triterpênicos como  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, lupeol, taraxasterol, calenduladiol; carotenóides (BISSET, 1994; AKIHISA et al, 1996); cumarinas; ácidos fenolcarboxílicos, incluindo ácido salicílico (ISSAC, 1992). Entre os flavonóides foram isolados 3-O-glicosídeos de isoramnetina e quercetina, incluindo isoquercetina, rutina, narcisina, neoesperidosídeo, hiperosídeo (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; ROMBI, 1991; BISSET, 1994). A calêndula contém também óleo volátil (0,2% nas flores secas) rico em compostos terpenóides, incluindo mentona, isomentona, cariofileno, derivados mono e sesquiterpênicos oxigenados, ésteres livres de esteróis (ROMBI, 1991; ISSAC, 1992; BISSET, 1994; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996); polissacarídeos (10% pectina e 15% de polissacarídeos solúveis) e até 0,7% de alantoína (ISSAC, 1992).

## 2.2 ESPINHEIRA-SANTA

*Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reissek (Celastraceae) é uma espécie originária da América do Sul (SIMÕES et al, 1998) (Figura 2.2), podendo ser encontrada na região sul do Brasil, na Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (ALICE et al, 1996).



**Figura 2.2:** *Maytenus ilicifolia*

Fonte: [www.plantamed.com.br/fotos/maytenus-ilicifolia](http://www.plantamed.com.br/fotos/maytenus-ilicifolia)

Popularmente é conhecida como espinheira-santa, cancerosa, cancorosa, espinheira-divina (SILVA et al, 1991; ALICE et al, 1995; SIMÕES et al, 1998; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002) espinho-de-Deus, salva-vidas, coromilho-do-campo (SILVA et al, 1991; GUPTA, 1996;). No Paraguai a espécie também é conhecida como cangorosa e cancerosa (GUPTA, 1996), na Argentina, Uruguai e Chile, como cangorosa e quebradilho (SILVA et al, 1991).

As partes da planta utilizadas com fins terapêuticos são as folhas secas, encontradas em várias formas farmacêuticas, incluindo saches para infusão, tinturas, cápsulas com a planta moída e com extrato seco. Em 2002 a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek foi introduzida na Farmacopéia Brasileira quarta edição.

Na medicina popular, outras espécies do gênero *Maytenus*, como *Maytenus aquifolium* Martius e *Maytenus robusta* Reiss, são confundidas com a *Maytenus ilicifolia*. Além disso, existem espécies de outras famílias, que são conhecidas e até mesmo comercializadas como sendo espinheira-santa. Entre elas estão a *Sorocea bomplandii* (Moraceae) (VILEGAS et al, 1998; DI STASI et al, 1999) e a *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae) (DI STASI et al, 1999), duas espécies nativas da Mata Atlântica. Estas duas espécies apresentarem algumas similaridades fenotípicas com *Maytenus ilicifolia* (ALBERTON; FALKENBERG; FALKENBERG, 2002; ALBERTON et al, 2002).

Os primeiros estudos concretos sobre a atividade farmacológica e toxicidade de *Maytenus ilicifolia* surgiram em 1983 a partir do “Programa Brasileiro de Plantas

Medicinais” criado pela Central de Medicamentos (CEME). Estes estudos investigaram a principal atividade citada na medicina popular, atividade antiúlcera, além da toxicidade da espécie e seus possíveis efeitos adversos. Também foram realizados estudos clínicos de fase I (CARLINI; BRAZ, 1988; MENEZES; CARLINI, 1988; CARLINI et al, 1988; CARLINI; FROCHTENGARTEN, 1988; GEOCZE et al,1988).

Quanto aos metabólitos secundários da *Maytenus ilicifolia*, cerca de 30 substâncias já foram isoladas; entre os constituintes majoritários estão triterpenos, com esqueletos variados, ácido clorogênico,  $\beta$ -amirina (SIMÕES et al, 1998). Características das espécies do gênero *Maytenus* são os compostos chamados maitansinóides, como a maitensina, maitenprina e maitenbutina, que foram isolados de diversas partes da plantas, como folhas, caule e raízes (AHMED et al, 1981). Em extratos metanólicos de *Maytenus ilicifolia* foram isolados dois triterpenos, cangoronina e ilicifolina, juntamente com sete triterpenos: ácido maitenóico, D:B-friedoolean-5-en-3 $\beta$ ,29-diol, D:A-friedoolean-29-ol-3-ona, pristimerina, ácido salasperímico, isopristimerina III e isotingenona III (ITOKAWA et al, 1991). Foram isolados também quatro triterpenos dímeros, cangorosina A, atropcangorosina A, dihidroatropcangorosina A e cangorosina B (SHIROTA et al, 1997). Da casca das raízes foram isolados poliésteres sesquiterpênicos, denominados cangorinas A - J (ITOKAWA et al, 1993; ITOKAWA et al, 1994). De extratos hexânicos foram isolados friedelina e friedelanol (VILEGAS; LANÇAS; CERVI, 1994). Em folhas de *Maytenus ilicifolia* foram isolados três novos glicosídeos, ilicifolinosídeos A-C (ZHU; SHARAPIN; ZHANG, 1997). De infusões aquosas de folhas *M. ilicifolia* foram isolados flavonóides di, tri e tetrasacarídeo derivado do canferol, junto com trissacarídeo da quercetina (LEITE et al, 2001). Quatro novos triterpenóides com vários esqueletos, maitefolinas A-C, e cafeato de 3-uvaol foram isolados de extratos metanólicos de folhas de *M. ilicifolia* (OHSAKI et al, 2004). Adicionalmente, partir de uma extração aquosa de hidróxido de potássio 2% a quente, e cromatografia de troca-iônica foi isolada uma arabinogalactana das folhas de *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI et al, 2003).

## 2.3 FUNCHO

*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare* (Apiaceae) é uma espécie nativa da região mediterrânea (Figura 2.3), cultivada em diversos países da Europa (Alemanha, Hungria, Bulgária), Ásia (China, Índia, Japão) e norte da África (Egito) pela importância de sua essência (COSTA, 1986; SAMUELSSON, 1992; BISSET, 1994; BRUNETON, 1993; LEUNG; FOSTER; FOSTER, 1996).



**Figura 2.3:** *Foeniculum vulgare*

Fonte: [iep.water.ca.gov/.../vegetation/Anise1.jpg](http://iep.water.ca.gov/.../vegetation/Anise1.jpg)

No Brasil o funcho foi introduzido no início da colonização, tendo encontrado condições ideais para seu desenvolvimento, pois se adapta bem em diversos climas, embora prefira climas temperados (COSTA, 1986). Popularmente é conhecido como funcho (SCHULTZ, 1985; COSTA, 1986; SIMÕES et al, 1998), endro (SOUZA et al, 1991) e erva-doce brasileira (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000a).

Os frutos maduros secos constituem a parte da planta freqüentemente utilizada para fins medicinais (TYLER, 1993, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000a; SIMÕES; SPITZER, 2004). Algumas vezes são chamados, equivocadamente, de sementes, devido ao seu pequeno tamanho (PEIRCE, 1999; TYLER 1993; LEUNG; FOSTER; FOSTER, 1996).

As formas farmacêuticas contendo funcho predominantes no mercado, são xaropes, tinturas e extratos, além de frutos secos em sachês para infusão (chás). Estas preparações farmacêuticas são empregadas como carminativas, antiespasmódicas e expectorante (TYLER, 1993; BISSET, 1994; LEUNG; FOSTER; FOSTER, 1996; ESCOP, 1996; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINKMANN, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2004). Tradicionalmente o funcho é empregado com diferentes finalidades, desde o emprego na culinária, como aromatizante e flavorizante, até para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (SIMÕES et al, 1998; PEIRCE, 1999; MILLS; BONE, 2000).

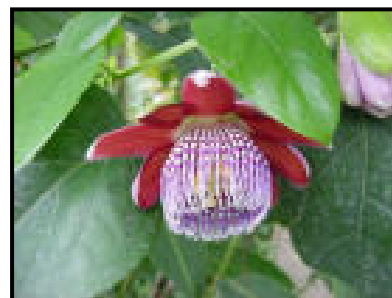


Monografias do *Foeniculum vulgare* Mill. *ssp. vulgare var. vulgare* podem ser encontradas nas Farmacopéias Alemã (1991), Européia (2002), Portuguesa (2002b), bem como na Farmacopéia Brasileira (2000a), entre outras.

Os frutos contêm 9% a 28% de óleo fixo composto, principalmente, pelos ácidos petroselinico (60-75%), oléico, linoléico e palmítico. O óleo volátil está presente na faixa de 1,5 a 8,6% tendo como componente majoritário o trans-anetol, em menor quantidade a fenchona (componente diferencial da erva-doce), estragol (metil-chavicol), limoneno, canfeno, foeniculina e  $\alpha$ -pineno. Outros componentes incluem hidrocarbonetos monoterpênicos, álcool fenchílico, anisaldeído, ácido *p*-anísico, miricetina e apiol; estes dois últimos estão presentes em variedades doces cultivadas. As folhas possuem flavonóides derivados da quercetina. As raízes apresentam compostos fenólicos, cumarinas, hidrocarbonetos terpênicos, ácidos orgânicos (málico, cítrico, cumárico, cinâmico, caféico, ferúlico e quínico), sais minerais e também óleo volátil, embora em menor quantidade (0,12%) quando comparadas aos frutos (BISSET, 1994; ESCOP, 1996; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINKMANN, 2000).

## 2.4 MARACUJÁ

O gênero *Passiflora* possui cerca de 400 espécies nativas da América tropical (Figura 2.4), desde o sul dos Estados Unidos, México e América Central até o sul da América do Sul, incluindo o Brasil. Algumas espécies são cultivadas também em outras regiões subtropicais e tropicais, como Flórida e Índia (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; REGINATTO et al, 2001).



**Figura 2.4:** *Passiflora alata*

Fonte: [www.mytho-fleurs.com/images](http://www.mytho-fleurs.com/images)

A importância econômica das espécies de *Passiflora* é evidenciada pelo seu amplo emprego na indústria de alimentos e na produção de fitoterápicos, comercializados no Brasil (REGINATTO et al, 2001). Entre as várias espécies do gênero, *P. incarnata* e *P. alata* são as duas espécies mais estudadas e utilizadas em medicamentos fitoterápicos. Além disso, no Brasil, *P. edulis* é a espécie de maior comercialização na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica (VALE; LEITE, 1983).

As partes da planta utilizadas em preparações farmacêuticas e cosméticas são as partes aéreas secas, que são utilizadas na forma de tintura, extrato seco, extrato fluido e estão disponíveis na forma de comprimidos, drágeas e soluções orais (ALEXANDRE, 2004). O extrato das folhas é utilizado como componente ativo em diversas preparações farmacêuticas registradas no Brasil (GONZALÉZ-ORTEGA et al, 1989). Seu uso na indústria, como na medicina popular é amplamente difundido, principalmente por suas propriedades sedativas e antiespasmódicas (PETRY et al, 2001).

Nas farmacopéias de outros países, como a Farmacopéia Européia (2002), Portuguesa (2002b) e a Alemã (1991) entre outras, pode ser encontrada a monografia de *Passiflora incarnata*. Na Farmacopéia Brasileira primeira (1929) e terceira edição (1977) consta a monografia da *Passiflora alata* Curtis.

*Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) é uma espécie nativa do Brasil, ocorrendo nas regiões nordeste (Bahia), Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e também no Paraguai e Peru. As espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas popularmente no Brasil, como maracujá, uma palavra de origem tupi-guarani (“muruke’ia”), que provavelmente significa “comida preparada em cuia”, devido aos frutos comestíveis. *Passiflora alata* é conhecida popularmente como maracujá, maracujá-amarelo, maracujá-de-refresco, maracujá-do-grande, maracujá-grande, flor-da-paixão, maracutango ou maracutão, maracujá-mamão (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

Os estudos referentes à composição química de diversas espécies de maracujá focaram, principalmente, alcalóides e flavonóides, sendo que os teores variam de forma quali e quantitativa de uma espécie para outra (OGA et al, 1984).

Os flavonóides são representados, de forma majoritária, pelos di-C-heterosídeos derivados da apigenina e da luteolina (GEIGER; MARKHAM, 1986 apud QIMIN et al, 1991). Um dos primeiros estudos sobre *P. alata* relatou o isolamento de 2”-xilossil-vitexina, um flavonóide ainda não encontrado em *P. incarnata* e *P. edulis* (ULUBELEN et al, 1982). Outros flavonóides mais conhecidos, como: orientina, vitexina, isovitexina, isoorientina (homoorientina) e rutina, foram encontrados em outros trabalhos com *P. alata* (OGA et al, 1984). Estudos mais antigos mencionam que os alcalóides presentes na espécie *Passiflora* são do tipo indólico, derivados do sistema  $\beta$ -carbonila, substituídos em C-1 por um grupo metila, denominados de harmanos (LOHDEFINK; KARTING, 1974 apud REHWALD; MEIER; STICHER, 1994; BRASSEUR; ANGENOT, 1984; LUTOMSKI et al, 1981 apud ESCOP, 1997). No entanto, estudos com metodologias mais avançadas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não têm confirmado a presença desses alcalóides em espécies de *Passiflora* (REHWALD; MEIER; STICHER, 1995) ou pelos menos não nas concentrações descritas em estudos anteriores (GRICE; FERREIRA; GRIFFITHS, 2001).

Além dos flavonóides, também foram identificados outros compostos nas folhas de *P. alata*, tais como glicosídeos esteroidais triterpênicos: 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-estigmasterol; ácido 3-O-  $\beta$ -D-glicopiranosil-pleanólico, ácido 3-O-  $\beta$  – D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$  –D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O-  $\beta$  –D-glicopiranosil-

(1→2)- β -D-glicopiranosil-oleanóico e 9,19-ciclolanost-24Z-em-3 β ,21,26-tri-hidróxi-3,26-di-O-gentiobiose (REGINATTO et al, 2001).

## 2.5 MARCELA

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., (Asteraceae) é uma espécie nativa da América do Sul (Figura 2.5), principalmente das regiões sudeste subtropical e temperada (SIMÕES et al, 1998). Popularmente é conhecida como marcela, macela ou macela-do-campo (PIO CORREA, 1978, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001b). Nos países vizinhos é conhecida por “macela galega”, “marcela hembra”, marcelíta e yatei-caá (em tupi-guarani) (CHIRIANI, 1974).



**Figura 2.5:** *Achyrocline Satureioides*

Fonte: [novaescola.abril.uol.com.br/.../html/edart.htm](http://novaescola.abril.uol.com.br/.../html/edart.htm)

A marcela é amplamente utilizada na medicina popular, sendo-lhe atribuídas principalmente propriedades digestiva, antiespasmódica, carminativa, eupéptica, antidiarréica.

As partes da planta utilizadas em preparações farmacêuticas são as inflorescências secas, que são utilizadas na forma de infusão, tintura, extrato líquido, óleo de marcela ou pomada. Em 2002 a monografia de *Achyrocline satureioides* foi incluída na Farmacopéia Brasileira quarta edição.

Estudos que relacionam as atividades farmacológicas com a composição química da marcela demonstram que as ações gastrintestinais e anti-edematogênicas podem estar relacionadas com a presença de flavonóides. As atividades antiespasmódica e anti-edematogênica foram atribuídas à quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina (SIMÕES et al, 1988). Em experimentos em ratos, foi observada a atividade imunoestimulante, atribuída aos polissacarídeos (PUHLMANN et al, 1992; SANTOS et al, 1999). Para a quercetina, a luteolina, o ácido caféico, e a 3-O-metilquercetina foi evidenciada atividade antiviral *in vitro* (MUSCI, 1984; CASTRILLO; CARRASCO, 1987; DE MEYER et al, 1991).

A composição química da marcela foi estudada por diversos pesquisadores, tendo sido descrita a presença de compostos flavonoídicos: galangina, quercetina, 3-metóxi-quercetina, 3-metóxi-galangina (FERRARO; NORBEDO; COUSSIO, 1981);

7,4'-diidróxi-5-metóxi-flavona e 7-O-glicosídeo da 3-metóxi-quercetina (SIMÕES, 1984); 3,7-di-metóxi-quercetina, 5-hidróxi-3,6,7-trimetóxi-flavona (alnustina), 5,7-diidróxi-3,8-di-metóxi-flavona (gnafalina), 5,8-diidróxi-3,7-di-metóxi-flavona (isognafalina), (MESQUITA et al, 1986); 6-hidróxi-quercetina (quercetagenina), 4'-metóxi-quercetina (tamarixetina) (BROUSSALIS et al, 1989); 3,5-diidroxi-6,7,8-trimetóxi-flavona e 3,5-diidroxi-7,8-dimetóxi-flavona (LIMA, 1990 apud BETTEGA, 2000); ácidos fenólicos, caféico, clorogênico e isoclorogênico (SIMÕES, 1984; FERRARO; NORBEDO; COUSSIO, 1981; BROUSSALIS et al, 1989; DEMARCHELIER; COUSSIO; CICCIA, 1998). Entre os constituintes voláteis há o predomínio do  $\alpha$ -pineno, além de  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno e 1,8-cineol (LAMATY et al, 1991); há ainda constituintes diversos como os derivados da fenilpirona (HIRSCHMANN, 1984), cavapirona (KALOGA; HÄNSEL, CYBULSKI, 1983) e polissacarídeos (WAGNER et al, 1985 apud BETTEGA, 2000; PUHLMANN et al, 1992).

### 3 CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A cromatografia constitui um método físico-químico de separação dos constituintes de uma mistura, muito útil na análise de produtos vegetais. Diferentes técnicas cromatográficas são utilizadas na análise de drogas vegetais, principalmente quando acopladas a métodos de detecção adequados, como por exemplo, a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia em papel (CP), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa, entre outras. Além disso, ao empregar técnicas quantitativas na preparação das soluções de análise e padrões, bem como na detecção dos constituintes, a análise cromatográfica permite a determinação do teor dos constituintes ativos ou principais (FARIAS, 2004).

Os desenvolvimentos que ocorreram na área da cromatografia em camada delgada (CCD) transformaram-na de um conjunto de procedimentos analíticos semi-quantitativo em uma técnica com a qual se pode obter resultados quantitativos muito confiáveis (VOGEL, 2002). CCD para a análise quantitativa vem sendo utilizada, através da digitalização da placa e análise densitométrica das substâncias de interesse. Também são disponíveis placas de CCD de alta eficiência (*High Performance Thin Layer Chromatography*), assim como câmaras especiais para CCD horizontal, que possibilita grande economia de amostra e solventes (LIANG; XIE; CHAN, 2004).

Semelhante a cromatografia em coluna, existem muitos tipos de suporte, tanto de fase normal quanto de fase reversa, dependendo da polaridade dos componentes das amostras a ser analisada. Esta técnica é muito usada para avaliação de drogas vegetais e suas preparações (WHO, 1998). Além disso, pode ser utilizada em série para um grande número de amostras, além de possibilitar a resolução de problemas particulares de identificação. A cromatografia em camada delgada (CCD) é amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (EVANS, 1996; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004) e, por ser uma

metodologia simples, de custo acessível e de grande utilidade na análise de drogas vegetais, consta na maioria das monografias farmacopéicas atuais (Farmacopéia Européia, 2002; Farmacopéia Portuguesa, 2002a; Farmacopéia Brasileira, 1988a; Farmacopéia Alemã, 1991). Além disso, pode-se contar com algumas literaturas específicas sobre a análise de matérias-primas vegetais por CCD, as quais apresentam fotos ou desenhos de cromatogramas de diversas espécies medicinais (PACHALY, 1995; WAGNER; BLADT, 1996).

Além da identificação, a cromatografia em camada delgada permite inferências a respeito da pureza do material, como por exemplo, a contaminação da espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia*, com espécies morfológicamente semelhantes como a *Zollernia ilicifolia* e a *Sorocea blonplandii* (ALBERTON, 2001), ou ainda a verificação da contaminação das flores de arnica (*Arnica montana* L. ou *Arnica chamissonis* Less, ssp. folia (Nutt) Maguire) pela arnica-mexicana (*Calendula* ou *Heterotheca*) (FARMACOPÉIA ALEMÃ, 1991).

Para a caracterização do perfil cromatográfico de uma droga vegetal por CCD, é necessário a utilização da técnica e do sistema cromatográfico adequados para o grupo de constituintes avaliados, assim como, a utilização de padrões das substâncias características, de extratos de amostras autênticas ou, na ausência destes, de substâncias marcadoras. Além disso, a análise cromatográfica é uma alternativa para a identificação de matérias-primas vegetais adquiridas na forma de preparados fitoterápicos intermediários, como tinturas, extratos, óleos fixos e voláteis, entre outros (FARIAS, 2004).



## **3.2 OBJETIVOS**

- Comparar a aplicabilidade de diferentes sistemas cromatográficos com vistas a estabelecer um perfil cromatográfico adequado para as drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho, maracujá e marcela.

### 3.3 MATERIAIS

#### 3.3.1 Material vegetal

Os lotes das espécies analisadas (inflorescências de calêndula e marcela, frutos de funcho, folhas de espinheira-santa e partes aéreas de maracujá) foram adquiridos junto à empresa Shambala, em quantidade suficiente para a realização de todas as análises (1,0 Kg de cada planta). As plantas comercializadas por essa empresa foram originalmente identificadas, quando do início do plantio, através de uma cooperação com o Departamento de Botânica da UNISUL. Os materiais vegetais foram triturados em moinho de facas (Maqmont) e acondicionados em recipientes de vidro, devidamente fechados, armazenados em ambiente protegido da luz.

#### 3.3.2 Reagentes, soluções e substâncias reagentes

As análises cromatografias foram realizadas em placas de gel de sílica 60 GF<sub>254</sub> e placas de celulose, de procedência Merck e Macherey.

Para a detecção das substâncias nas placas cromatográficas foram utilizados como reagentes/ reveladores: reagente natural A; solução oxalobórica; anisaldeído sulfúrico; vanilina sulfúrica; ácido sulfúrico concentrado; ácido fosfomolibidico e solução ácida de permanganato de potássio. Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico, de procedência Vetec, Nuclear, Prontolab, Cinética Química, Sigma.

As substâncias marcadoras utilizadas foram: rutina (Sigma), ácido clorogênico (Sigma), ácido caféico (Sigma), anisaldeído (Vetec), óleo de oliva (Borges), catequina (Roth), epicatequina (Roth), quercetina (Roth), 3-O-metil-quercetina, quercetina 3,7-O-dimetil éter, luteolina (Roth) e eugenol (Prontolab)

Para a determinação do perfil cromatográfico da espinheira-santa foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Miriam Falkenberg, do Departamento de

Ciências Farmacêuticas da UFSC, um extrato diclorometânico de uma amostra autêntica de *Maytenus ilicifolia*.

## **3.4 MÉTODOS**

### **3.4.1 Preparação dos extratos**

Os extratos vegetais, para a análise cromatográfica das cinco espécies em questão, foram preparados de acordo com o preconizado nas bibliografias consultadas (Tabelas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Para as matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa e maracujá foram preparados, ainda, extratos etanólicos e hidroetanólicos 50%, com o intuito de avaliar o perfil cromatográfico obtido a partir dos diferentes extratos, considerando principalmente o custo e a toxicidade dos mesmos. Esses extratos foram obtidos pelo aquecimento, sob refluxo, de 1,0 g da droga vegetal em 10 mL do solvente, durante 10 minutos. Para a matéria-prima vegetal marcela foram empregados 20 mL do solvente para a preparação dos extratos devido ao volume da matéria-prima vegetal.

### **3.4.2 Análise cromatográfica e identificação das substâncias marcadoras**

Os extratos preparados foram submetidos à análise cromatográfica. Primeiramente foram testados os sistemas preconizados na literatura consultada (Tabelas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). Ao verificar a necessidade e/ou a possibilidade de otimização dos sistemas já existentes, foram testados também diferentes sistemas cromatográficos, testando-se diferentes eluentes e reveladores. Cabe ressaltar que todas as análises foram realizadas em no mínimo duas placas de sílica gel de procedência diferente e em dias diferentes com o intuito de confirmar o perfil cromatográfico obtido e de garantir a reprodutibilidade dos resultados apresentados.

**Tabela 3.1:** Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal calêndula, de acordo com as literaturas consultadas.

<b>Suporte</b>	<b>Solução amostra</b>	<b>Substâncias Marcadoras</b>	<b>Eluente (v/v)</b>	<b>Deteção</b>
<b>Sistema 1 – FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2001a; WAGNER; BLADT, 1996.</b>				
Sílica gel GF <sub>254</sub>	Extrato hidroetanólico 55% (1:20, m/p)*	Rutina Ac. clorogênico	Acetato de etila (100) Ácido fórmico(11) Ác. acético glacial (11) Água (27)	Reagente natural A
<b>Sistema 2 – FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2002; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002a;</b>				
Sílica gel GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:10, m/v)**	Rutina Ácido clorogênico Ácido caféico	Acetato de etila R (80) Água R (10) Ác. fórmico anidro R (10)	Reagente natural A
<b>Sistema 3 – PACHALY, 1999;</b>				
Sílica gel GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:10, m/v)**	Rutina Hiperosídeo Ác. clorogênico Ác. caféico	Acetato de etila (65) Água (20) Ác. fórmico anidro (15)	Reagente natural A ou sol. oxalobórica
<b>Sistema 4 – BISSET, 1994</b>				
Sílica gel GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:10, m/v)**	Hiperosídeo Rutina Ácido clorogênico Ácido caféico	Acetato de etila (50) Água (10) Ác. fórmico anidro (10) Metiletilcetona (30)	Reagente natural A

\* extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 20 min. \*\* extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 10 min.

**Tabela 3.2:** Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal espinheira-santa, de acordo com as literaturas consultadas.

<b>Suporte</b>	<b>Solução amostra</b>	<b>Substâncias Marcadoras</b>	<b>Eluente (v/v)</b>	<b>Deteção</b>
<b>Sistema 1 – FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato aquoso (1:10, m/v).*	Catequina Epicatequina	Acetato de etila (95) Ác. fórmico (5) Água (5)	Vanilina sulfúrica/Δ
<b>Sistema 2 - ROGERS; ABBOUTT; van WYK, 1998.</b>				
Silicagel GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:10, m/v).**	Catequina Epicatequina	Clorofórmio (50) Acetato de etila (40) Ác. fórmico	Anisaldeído sulfúrico/Δ
<b>Sistema 3 – ALBERTON, 2001.</b>				
Silicagel GF <sub>254</sub>	Extrato diclorometânico (1:10, m/v).***	Friedelina Friedelanol	Éter de petróleo (75) Diclorometano (25)	Anisaldeído sulfúrico/Δ

\* extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 15 min; filtrado sob pressão reduzida; volume completado para 50 mL; \*\* extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 10 min; \*\*\* extrato obtido a frio com agitação, por 15 min; Δ: aquecimento.

**Tabela 3.3:** Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal funcho, de acordo com as literaturas consultadas.

Suporte	Solução amostra	Substâncias Marcadoras	Eluente (v/v)	Deteção
<b>Sistema 1 – FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000a.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato diclorometânico (1:20, m/v).*	Anetol Fenchona	Tolueno (100)	Ácido sulfúrico/Δ
<b>Sistema 2 – FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002b.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato diclorometânico (1:17, m/p).*	Anetol Fenchona	Hexano (20) Tolueno (80)	Ácido sulfúrico/Δ
<b>Sistema 3 – WAGNER, 1995.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato diclorometânico (1:15, m/p).	Anetol Fenchona	Tolueno (93) Acetato de etila (7)	Vanilina sulfúrica ácida/Δ
<b>Sistema 4 – BISSET, 1994.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato diclorometânico (1:17, m/p).**	Anetol Anisaldeído Óleo de oliva	Diclorometano (100)	Sol. ác. fosfomolibco/Δ + Sol. permanganato de potássio/Δ.
<b>Sistema 5 – PACHALY, 1999.</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato de acetato de etila (1:20, m/p).***	Anetol Anisaldeído Óleo de oliva	Tolueno (93) Acetato de etila (7)	Sol. ác. fosfomolibco/Δ + Sol. permanganato de potássio/ Δ.

\* extrato obtido a frio com agitação, por 15 mim; seco em banho-maria, temperatura inferior a 60°C e o resíduo retomado em 2 mL de tolueno; \*\* extrato obtido a frio com agitação, por 15 mim; seco com sulfato de sódio anidro; \*\*\* extrato obtido a frio com agitação, por 15 mim; Δ: aquecimento.

**Tabela 3.4:** Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal maracujá, de acordo com as literaturas consultadas.

Suporte	Solução amostra	Substâncias Marcadoras	Eluente (v/v)	Deteção
<b>Sistema 1- FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2002; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002b; BISSET, 1994.*</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:5, m/p).**	Rutina Hiperosídeo	Acetato de etila (50) Metiletilcetona (30) Ác. fórmico (10) Água (10)	Reagente natural A
<b>Sistema 2 – WAGNER; BLADT, 1996.*</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:5, m/p).**	Rutina Hiperosídeo Ac. clorogênico	Acetato de etila (100) Ácido fórmico (11) Ác. acético glacial (11) Água (26)	Reagente natural A
<b>Sistema 3 – PACHALY, 1999.*</b>				
Gel de sílica GF <sub>254</sub>	Extrato metanólico (1:10, m/p).**	Rutina Hiperosídeo	Acetato de etila (50) Metiletilcetona (15) Ác. fórmico (15) Água (20)	Reagente natural A

\* metodologia preconizada para *Passiflora incarnata*; \*\* extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 10 min;

**Tabela 3.5:** Preparação das amostra e sistemas cromatográficos empregados para a matéria-prima vegetal marcela, de acordo com as literaturas consultadas.

<b>Suporte</b>	<b>Solução amostra</b>	<b>Substâncias Marcadoras</b>	<b>Eluente v/v</b>	<b>Deteção</b>
<b>Sistema 1 – FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001b.</b>				
Placa de celulose	Extrato aquoso (10:100, m/p), extraído c/ acetato de etila; resíduo retomado em metanol.*	Quercetina 3-O-metil-quercetina Luteolina Ác. caféico	Clorofórmio (50) Ác. acético glacial (45) Água (5)	Reagente natural A
<b>Sistema 2 – SONAGLIO, 1987.</b>				
Sílica gel G60	Extrato aquoso (10:100, m/p), extraído c/ acetato de etila; resíduo retomado em metanol.*	Quercetina 3-O-metil-quercetina Luteolina Ác. caféico	Tolueno (40) Clorofórmio (25) Acetona (35)	Reagente natural A

\*extrato obtido por aquecimento sob refluxo, por 1h; extraído 2x com 50 mL + 4x com 25 mL de acetato de etila; lavado 2x com 50 mL água; evaporado em evaporador rotatório e o resíduo retomado em 15 mL de metanol.



## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

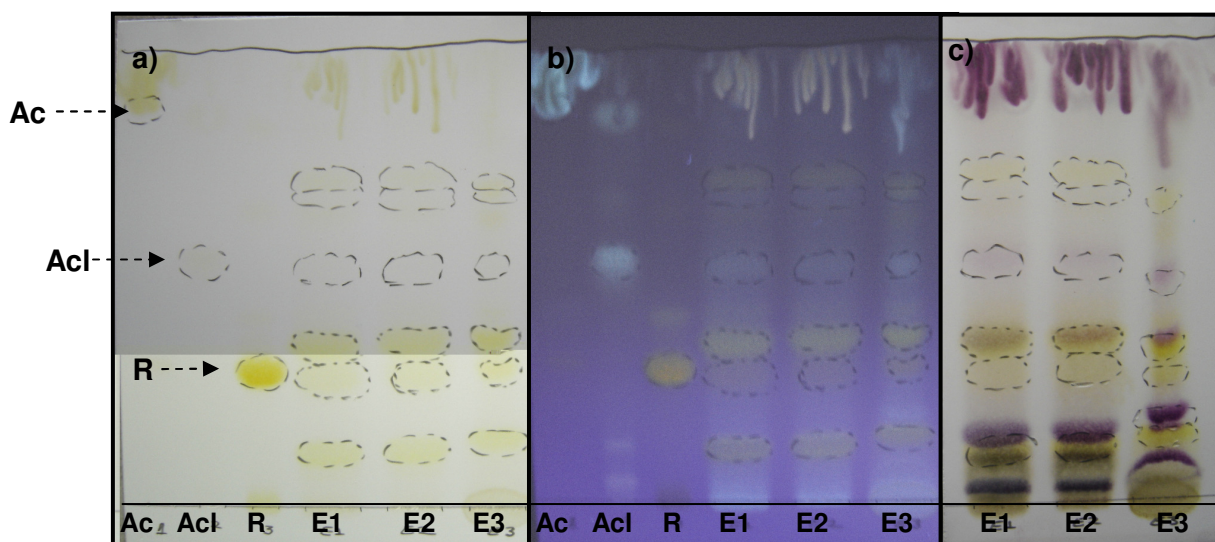
### 3.5.1 Calêndula

Nas placas cromatográficas foram aplicados iguais quantidades (10 µL) dos extratos metanólicos, etanólicos e hidroetanólicos 50%. As substâncias utilizadas como marcadoras para a determinação do perfil cromatográfico da calêndula foram ácido caféico, ácido clorogênico e a rutina e, estas foram aplicadas apenas em quantidade suficiente para sua visualização em luz UV<sub>254</sub>. Os eluentes empregados foram: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial, água (100:11:11:26, v/v/v/v); acetato de etila, água, ácido fórmico (80:10:10, v/v/v); acetato de etila, água, ácido fórmico (65:20:15, v/v/v) e acetato de etila, água, ácido fórmico, metiletilcetona (50:10:10:30, v/v/v/v). Para a detecção dos constituintes químicos, foram testados como reveladores o reagente natural A, a solução oxalo-bórica e o anisaldeído sulfúrico.

Quanto aos extratos aplicados na placa cromatográfica, não foram verificadas diferenças qualitativas no perfil cromatográfico entre os extratos metanólico e etanólico; em relação ao extrato hidroetanólico 50% verificou-se uma diferença pequena quanto ao perfil cromatográfico obtido, quando comparado com os extratos metanólico e etanólico. Cabe ressaltar, que a relação droga/solvente do extrato hidroetanólico era a metade da concentração dos dois outros extratos. Entre os eluentes empregados na determinação do perfil cromatográfico da calêndula foram observadas variações quanto à separação das substâncias detectadas e quanto aos valores de R<sub>f</sub> obtidos. De forma geral, todos os sistemas testados se mostraram adequados para a caracterização da espécie. No entanto, com o eluente acetato de etila, ácido fórmico e água (80:10:10, v/v/v) observou-se uma separação mais nítida dos constituintes químicos presentes no extrato. Nos cromatogramas referentes ao padrão de ácido clorogênico, observa-se a presença de manchas adicionais de fluorescência azul, provavelmente devidas ao ácido caféico derivado da decomposição desse éster cafeoil-quínico.

Quanto aos reveladores utilizados para a detecção dos flavonóides verificou-se que a solução oxalobórica, embora apresente um custo relativamente baixo, não

possibilitou a visualização e a diferenciação da coloração das substâncias detectadas com nitidez, diferente do observado ao utilizar o reagente natural A como revelador. Após a visualização dos cromatogramas sob luz visível e luz UV 365 nm (Figura 3.1a e 3.1b), os mesmos foram revelados com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento, com o intuito de verificar o perfil cromatográfico das saponinas presentes na calêndula. Ao analisar o cromatograma obtido verificou-se que a co-revelação da placa cromatográfica com anisaldeído sulfúrico possibilitou a obtenção de um elemento adicional na identificação da espécie (Figura 3.1c), embora não tenham sido empregadas substâncias de referência para saponinas da calêndula.



**Figura 3.1:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal calêndula (*Calendula officinalis*). Suporte: gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck). **Ac:** ácido caféico. **Acl:** ácido clorogênico. **R:** rutina. **E1:** extrato metanólico. **E2:** extrato etanólico. **E3:** extrato hidroetanólico 50%. Eluente: acetato de etila, ácido fórmico, água (80:10:10, v/v/v). **a)** Revelador: reagente natural A, luz visível. **b)** Revelador: reagente natural A, luz UV 365 nm. **c)** Revelador: reagente natural A + anisaldeído/ $\Delta$ , luz visível.

### 3.5.2 Espinheira-santa

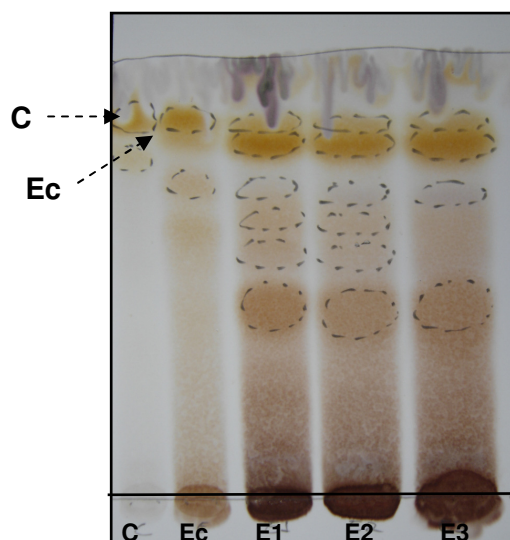
As substâncias marcadoras utilizadas para a caracterização do perfil cromatográfico, através dos precursores dos taninos presentes na espinheira-santa foram catequina e epicatequina, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2002). Estas substâncias foram aplicadas apenas em quantidade suficiente para sua visualização sob luz UV<sub>254</sub>. Nas placas cromatográficas, foram aplicadas quantidades iguais (10 µL) dos extratos aquoso, metanólico e etanólico. Os eluentes empregados foram acetato de etila, ácido fórmico, água (95:5:5, v/v/v); clorofórmio, acetato de etila, ácido fórmico (5:4:1, v/v/v). A vanilina sulfúrica foi empregada como revelador.

Para a caracterização do perfil cromatográfico obtidos através dos constituintes triterpenóides, friedelina e friedelan-3-ol (VILEGAS; LANÇAS; CERVI, 1994), foram aplicados quantidades iguais (10 µL) de um extrato diclorometânico de uma amostra autêntica de *Maytenus ilicifolia*<sup>1</sup> e de um extrato diclorometânico preparado a partir do lote de espinheira-santa adquirido para a realização das análises; o eluente utilizado foi éter de petróleo, diclorometano (3:1, v/v) e o revelador anisaldeído sulfúrico.

Quanto aos diferentes extratos aplicados, para caracterização do perfil cromatográfico da espinheira-santa, através dos taninos, não foram observadas diferenças qualitativas para os cromatogramas obtidos com os extratos metanólico, etanólico e aquoso. No entanto, em ambos os sistemas empregados não foi possível a separação das substâncias marcadoras utilizadas, catequina e epicatequina, além disso, os R<sub>f</sub>s dessas substâncias apareceram muito próximos à linha de frente do solvente, o que caracterizou a não aplicabilidade dos mesmos, visto a ausência de resolução no sistema preconizado.

O cromatograma obtido ao utilizar o eluente acetato de etila, ácido fórmico e água (95:5:5, v/v/v) e vanilina sulfúrica como revelador está apresentado na Figura 3.2.

<sup>1</sup> Agradeço a Profa. Dra. Mirian Falkenberg da UFSC, pela disponibilização do extrato diclorometânico de *Maytenus ilicifolia* autêntica.



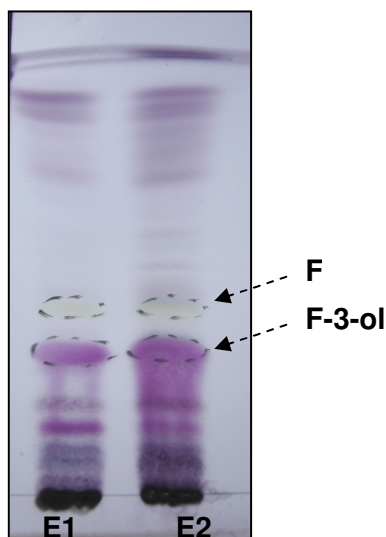
**Figura 3.2:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) com base nos precursores dos taninos presentes na espécie. Suporte: gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck). **C**: catequina. **Ec**: epicatequina. **E1**: extrato aquoso. **E2**: extrato metanólico. **E3**: extrato etanólico. Eluente: Acetato de etila, ácido fórmico, água (95:5:5, v/v/v). Revelador: vanilina sulfúrica.

A não separação da catequina e da epicatequina, em placas de sílica gel, já tinha sido referida por Kolodje (1980). O autor refere ainda que a separação desse par de diastereoisômeros em gel de sílica somente é possível após o processo de derivatização (no caso, acetilação).

Ao analisar os dois extratos diclorometânicos, aplicados para a caracterização do perfil cromatográfico da espinheira-santa através dos constituintes triterpênicos, constatou-se a similaridade dos cromatogramas obtidos. Cabe ressaltar que, apesar da não utilização dos padrões dos marcadores propostos neste trabalho, o extrato diclorometânico de amostra autêntica de *Maytenus ilicifolia* empregado foi o mesmo utilizado para a caracterização do perfil cromatográfico no trabalho realizado por Alberton (2001) onde os padrões de friedelina e friedelan-3-ol tinham sido empregados e confirmaram o perfil cromatográfico descrito abaixo.

Em ambos os extratos, as substâncias marcadoras propostas, friedelina e friedelan-3-ol, podem ser observadas de forma bem característica: a friedelina seria a mancha de coloração amarela no terço médio da placa cromatografia e o friedelan-3-ol a mancha de coloração violeta intenso, logo abaixo da mancha relativa à friedelina. Além das substâncias marcadoras, várias outras manchas de coloração

violeta e azulada podem ser visualizadas na parte inferior e superior da placa cromatográfica (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) com base nos constituintes triterpenóicos friedelina e friedelanol. **E1:** extrato diclorometânico de amostra autêntica de *Maytenus ilicifolia*. **E2:** extrato diclorometânico da droga vegetal analisada. Eluente: éter de petróleo, diclorometano (3:1, v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico. **F:** friedelina; **F-3-ol:** friedelan-3-ol.

Cabe ressaltar que a friedelina e o friedelan-3-ol já foram propostos anteriormente como marcadores para *Maytenus ilicifolia*, mostrando também sua utilidade no controle de qualidade de fitoterápicos à base de espinheira-santa através de diversas metodologias (VILEGAS; LANÇAS; CERVI, 1994). Outro fator importante na utilização desses marcadores está relacionado com a ausência dos mesmos em amostras de *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea Bonplandii*, duas espécies freqüentemente confundidas com a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), o que confirma a aplicabilidade do sistema empregado e proposto para a identificação da espécie em questão, assim como sua aplicabilidade para a diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes (ALBERTON, 2001).

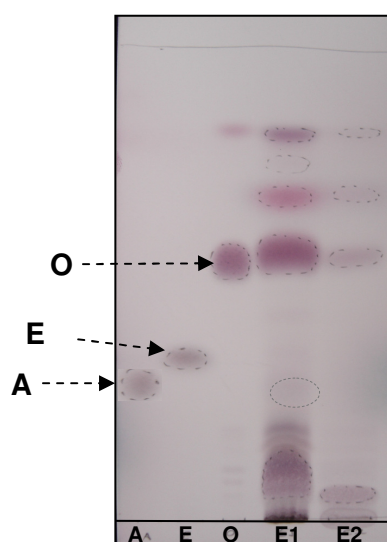
### 3.5.3 Funcho

As substâncias utilizadas como marcadoras para a determinação do perfil cromatográfico do funcho foram anisaldeído, óleo de oliva (PACHALY, 1995) e eugenol (WAGNER; BLADT, 1996). Estas substâncias foram aplicadas apenas em quantidade suficiente para sua visualização após a revelação. Nas placas cromatográficas foram aplicados 10 µL dos extratos diclorometânico e acetato de etila. Os eluentes empregados foram: tolueno (100); hexano, tolueno (20:80, v/v); tolueno, acetato de etila (93:7, v/v); diclorometano (100). Para a revelação dos constituintes químicos foram empregados os seguintes reagentes/reveladores: ácido sulfúrico concentrado, vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico e solução de ácido fosfomolibdico seguida de solução de permanganato de potássio.

Ao analisar os cromatogramas obtidos para o funcho, através da aplicação dos dois extratos, constatou-se que o extrato diclorometânico apresentou um número maior de manchas e coloração mais intensa, o que indica um poder extrativo maior que o acetato de etila sobre os constituintes químicos presentes na espécie. No entanto, ambos os extratos permitem a visualização e a identificação das substâncias de interesse. Entre os eluentes empregados observaram-se variações em relação à separação dos constituintes químicos detectados e seus respectivos valores de R<sub>f</sub>. O eluente que possibilitou a obtenção do melhor perfil cromatográfico foi tolueno: acetato de etila (93:7, v/v). Quanto aos reveladores utilizados, verificou-se a não praticidade da utilização do ácido sulfúrico concentrado e da solução de ácido fosfomolibdico: o ácido sulfúrico por ser um produto agressivo e altamente corrosivo e a solução de ácido fosfomolibdico apresenta como desvantagem a quantidade relativamente alta (10g para 100mL) para preparação do reagente, o fato de o reagente ter de ser preparado e usado na hora, além disso, após a revelação todas as manchas detectadas desenvolvem a mesma coloração, ou seja, azul escuro, o que dificulta a diferenciação das substâncias. Para a determinação do perfil cromatográfico do funcho pode-se dizer que vanilina e anisaldeído sulfúrico se equivalem como reveladores. Entre os dois reveladores foram verificadas apenas

diferenças na coloração das manchas detectadas. Além disso, ambos são reagentes comuns nos laboratórios, de fácil manuseio e apresentam custo relativamente baixo.

Na parte superior do cromatograma obtido, com o extrato diclorometânico, pode-se observar uma mancha violeta na mesma altura da mancha correspondente ao óleo de oliva, referente aos triglicerídeos. Logo acima dela observa-se uma mancha de coloração rósea provavelmente relativa ao anetol. O anisaldeído aparece na parte inferior do cromatograma como uma mancha violeta-acinzentada pálida, na mesma posição que a substância marcadora. O eugenol foi aplicado como substância marcadora para a fenchona, conforme proposto por Wagner e Bladt (1996), no entanto, nenhuma mancha foi observada no cromatograma da solução amostra com o mesmo valor de Rf referente ao eugenol (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal funcho (*Foeniculum vulgare*). **A:** anisaldeído. **E:** eugenol. **O:** óleo de oliva. **E1:** extrato diclorometânico. **E2:** extrato de acetato de etila. Eluente: tolueno, acetato de etila (93:7, v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Vale salientar que a fenchona esta presente em baixas concentrações no funcho amargo (*Foeniculum vulgare* Mill. ssp *vulgare* var. *vulgare*) (0,4 a 0,8%), já no funcho doce (*Foeniculum vulgare* Mill. ssp *vulgare* var. *dulce*) sua concentração pode varia de 12,0 a 22,0% (Wagner, 1996).

### 3.5.4 Maracujá

As substâncias marcadoras utilizadas para a determinação do perfil cromatográfico dos flavonóides presentes nas partes aéreas do maracujá foram ácido caféico, ácido clorogênico e a rutina. Para a determinação do perfil cromatográfico das saponinas, as substâncias marcadoras utilizadas foram R3 e R10, substâncias isoladas da espécie e descritas como ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1-2)glicopiranosil-oleanólico<sup>2</sup> e quadrangulosídeo<sup>2</sup>, respectivamente. Em ambos os casos as substâncias marcadoras foram aplicadas apenas em quantidade suficiente para sua visualização sob luz UV<sub>254</sub> ou após a revelação. Nas placas cromatográficas foram aplicadas quantidades iguais (10 µL) dos extratos metanólico, etanólico e hidroetanólico 50%. Além dos eluentes cromatográficos apresentados na tabela 3.4, outros eluentes foram testados com o intuito de otimizar o perfil cromatográfico obtido, entre eles: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial, água (100:11:11:27, v/v/v/v); acetato de etila, metiletilcetona, água, ácido fórmico, (50:30:10:10, v/v/v/v); acetato de etila, acetona, ácido fórmico e água (60:20:10:10, v/v/v/v); acetato de etila, água, ácido fórmico (80:10:10, v/v/v). Para a detecção dos constituintes químicos foram utilizados reagente natural A e anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. Além dos extratos de *Passiflora alata* foi aplicado um extrato hidroetanólico liofilizado de *Passiflora edulis*<sup>2</sup> (E4) para a visualização dos diferentes perfis cromatográficos obtidos para as duas espécies.

Para os extratos testados, não foram verificadas diferenças qualitativas entre os perfis cromatográficos obtidos através do extrato metanólico e do hidroetanólico. O extrato etanólico apresentou uma menor intensidade na coloração das manchas detectadas após a revelação, quando comparado com os outros dois extratos (Figura 3.5). Quanto aos eluentes testados, foram verificadas diferenças entre os perfis cromatográficos obtidos, principalmente, em relação à separação dos constituintes químicos e aos seus valores de R<sub>f</sub>.

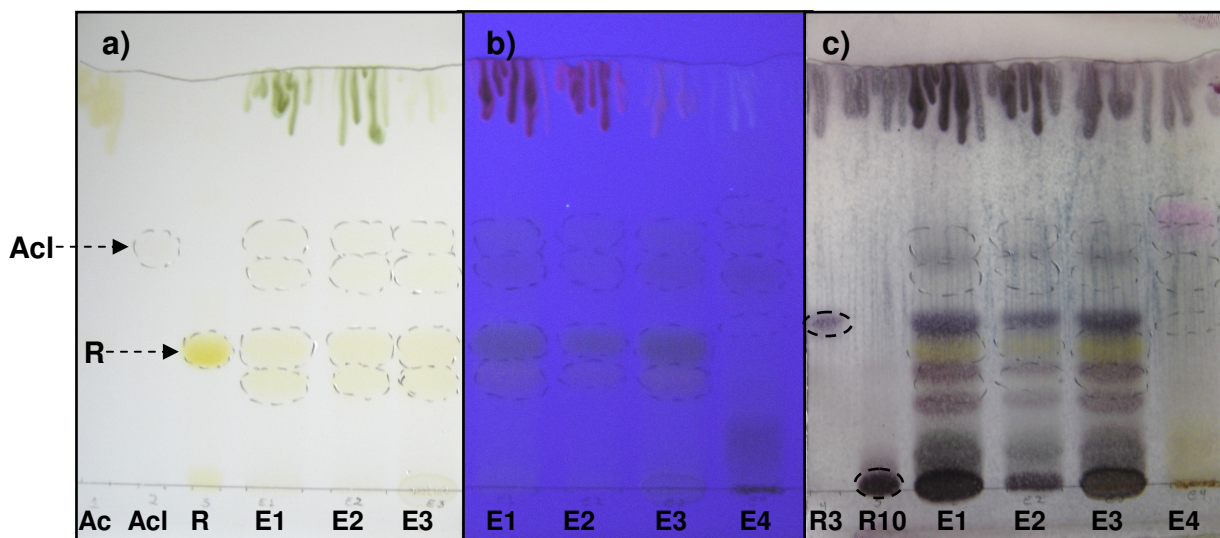
<sup>2</sup> Agradeço ao Professor Dr. Flávio H. Reginatto, da Universidade de Passo Fundo, pela disponibilização das substâncias marcadoras autênticas de *Passiflora alata*, assim como pelo extrato hidroetanólico liofilizado de *Passiflora edulis*.



O eluente que apresentou o melhor perfil cromatográfico, tanto para os flavonóides quanto para as saponinas presentes na *Passiflora alata*, foi acetato de etila, ácido fórmico, água (80:10:10, v/v/v), o mesmo eluente utilizado para a análise da calêndula.

Ao analisar os cromatogramas obtidos, após a revelação com reagente natural A, percebe-se quatro manchas bem evidentes na luz visível (Figura 3.5a). Sob luz UV 365 nm é possível a visualização de uma mancha esverdeada fluorescente, provavelmente referente a iso-orientina, praticamente na mesma altura que a mancha da rutina. Logo abaixo dela aparece uma mancha amarela-esverdeada, provavelmente relativa a isovitexina. Na parte superior da placa cromatográfica aparecem duas manchas com valores de R<sub>f</sub> próximos ao do ácido clorogênico, a de coloração amarelo-esverdeado fluorescente acredita-se ser referente a orientina e a mancha verde fluorescente logo acima dela à vitexina. A figura 3.5b, referente a esse cromatograma, não permite a diferenciação de cores como de fato verificada e descrita no texto.

Com o intuito de verificar o perfil cromatográfico das saponinas presentes na *Passiflora alata*, posteriormente à revelação da placa cromatográfica com reagente natural A, a mesma foi revelada com anisaldeído sulfúrico. Com a co-revelação observou-se o desenvolvimento de várias manchas de coloração violeta na parte inferior da placa cromatográfica. Pode-se observar ainda, que a substância R3 esta localizada logo acima da mancha referente à isoorientina, no entanto a R10 permaneceu junto a linha de aplicação. Assim como observado para calêndula a co-revelação da placa cromatográfica com anisaldeído sulfúrico possibilitou a obtenção de um elemento adicional na identificação da droga vegetal através da caracterização do perfil de saponinas da espécie (Figura 3.5c)

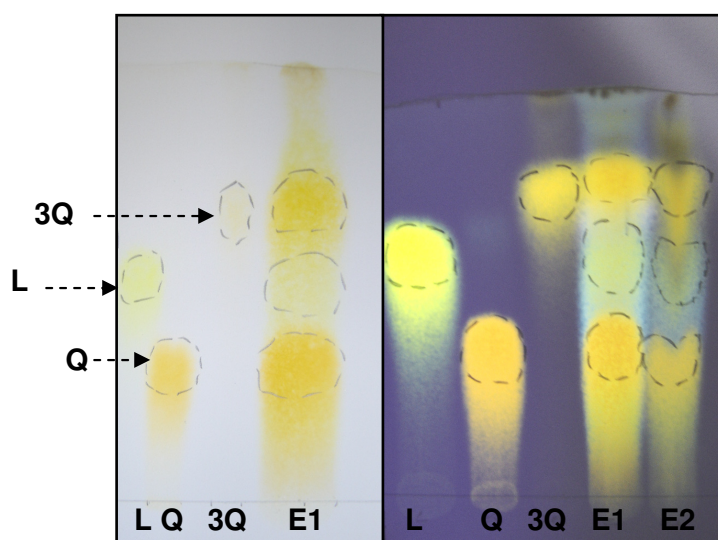


**Figura 3.5:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal maracujá (*Passiflora alata*). Suporte: gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck). **Ac:** ácido caféico. **Acl:** ácido clorogênico. **R:** rutina. **E1:** extrato metanólico. **E2:** extrato etanólico. **E3:** extrato hidroetanólico 50%. **E4:** extrato hidroetanólico liofilizado de *P. edulis*. **R3:** ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1-2)glicopiranosil-oleanólico. **R10:** quadrangulosídeo. Eluente: acetato de etila, ácido fórmico, água (80:10:10, v/v/v). **a)** Revelador: reagente natural A, luz visível; **b)** Revelador: reagente natural A, luz UV 365 nm; **c)** Revelador: reagente natural A + anisaldeído sulfúrico/Δ.

Através dos perfis cromatográficos obtidos pode-se verificar a diferença entre o perfil cromatográfico da *Passiflora alata* e da *Passiflora edulis*, tanto em relação ao perfil de flavonóides quanto ao das saponinas, confirmando a aplicabilidade do sistema empregado.

### 3.5.5 Marcela

Para a determinação do perfil de flavonóides presentes nas inflorescências de marcela, primeiramente foi empregado o procedimento preconizado na Farmacopéia Brasileira (2001b), o qual prevê a utilização da fração acetato de etila de um extrato aquoso como solução amostra e as condições descritas na Figura 3.6. Além disso, foram aplicados 10  $\mu$ L de extrato etanólico na placa cromatográfica, com o intuito de comparar o perfil cromatográfico obtido a partir dos dois extratos empregados.



**Figura 3.6:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal marcela (*Achyrocline satureioides*) - Sistema 1. Suporte: placa de celulose (Merck). **L:** luteolina. **Q:** quercetina. **3Q:** 3-O-metil-quercetina. **E1:** fração acetato de etila. **E2:** extrato etanólico. Eluente: clorofórmio, ácido acético glacial, água (50:45:5, v/v/v). **a)** Revelador: reagente natural A, luz visível; **b)** Revelador: reagente natural A, luz 365 nm.

De acordo com o observado na Figura 3.6, constata-se que apesar da formação de cauda, o sistema utilizado apresenta uma boa separação das substâncias marcadoras. Quanto aos dois extratos aplicados, pode-se observar que o cromatograma obtido a partir a fração acetato de etila apresentou maior intensidade de coloração das manchas. No entanto, a identificação das substâncias marcadoras também foi possível para o extrato etanólico. Este fato torna-se relevante ao considerar o tempo e a quantidade de solvente gasto para a preparação da solução amostra.

Além do sistema cromatográfico preconizado na Farmacopéia Brasileira (2001b) foram testados diversos outros sistemas utilizando placas de gel de sílica GF<sub>254</sub>, com o intuito de otimizar o processo de caracterização cromatográfica da matéria-prima vegetal em questão.

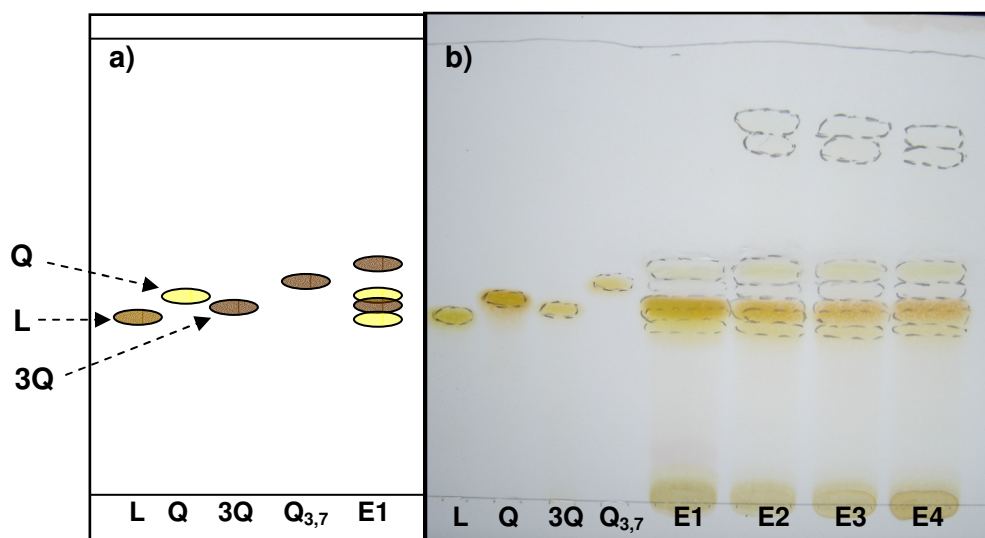
Os testes realizados tiveram como base o trabalho realizado por Sonaglio (1984). Os extratos aplicados e o revelador empregado foram os mesmos já referidos para as análises através do procedimento farmacopéico. As substâncias marcadoras também foram as mesmas, luteolina, quercetina e 3-O-metil-quercetina, no entanto, aplicou-se também como substância marcadora a quercetina 3,7-O-dimetil éter. Além dos eluentes cromatográficos apresentados na tabela 3.5, outros eluentes foram testados: 1) tolueno, clorofórmio, acetona (40:25:35, v/v/v) (SONAGLIO, 1984); 2) tolueno, clorofórmio, acetato de etila (40:25:35, v/v/v); 3) tolueno, diclorometano, acetato de etila (40:25:35, v/v/v); 4) tolueno, diclorometano, acetato de etila, ácido fórmico (30:25:45:10, v/v/v); 5) ciclohexano, diclorometano, acetato de etila (30:45:25, v/v/v); 6) diclorometano, etanol, água, ácido fórmico (140:40:4:1, v/v/v/v) – fase inferior.

No trabalho realizado por Sonaglio (1984), onde já tinham sido verificadas dificuldades na separação das substâncias marcadoras empregadas na determinação do perfil cromatográfico da marcela em placas de gel de sílica, o eluente 1 foi o que apresentou o melhor perfil cromatográfico, embora apresentasse a sobreposição das substâncias marcadoras. Para as demais análises realizadas, verificaram-se que os eluentes 2 e 3 apresentaram uma boa separação das substâncias marcadoras, no entanto, estas ficaram retidas no terço inferior da placa cromatográfica. Com o aumento da polaridade do eluente, verificou-se uma maior migração das substâncias marcadoras (eluente 4), mantendo as mesmas características de separação observadas anteriormente. Em relação à utilização de clorofórmio ou diclorometano nos eluentes testados, não foram verificadas diferenças quanto perfil cromatográfico obtido, por este motivo optou-se pela utilização do diclorometano devido ao maior grau de pureza do solvente.

Quanto ao perfil cromatográfico observado para a marcela ao empregar os eluentes 1, 2, 3 e 4, verificou-se uma característica bastante peculiar: a ordem de

migração verificada para as substâncias marcadoras foi inversa à esperada. A quercetina, substância mais polar, foi a que apresentou o maior valor de R<sub>f</sub>, enquanto a 3-O-metil-quercetina, substância mais apolar, ficou entre a quercetina e a luteolina. Acredita-se que esta característica esteja relacionada com a formação de pontes intramoleculares, o que alteraria a polaridade das substâncias aplicadas e com o fato de não haver partição nos sistemas testados, pois em nenhum dos eluentes empregados foi utilizado água como solvente. Os eluentes 5 e 6 não possibilitaram a separação e conseqüentemente a caracterização das substâncias marcadoras.

Apesar do perfil cromatográfico apresentar essa característica bastante peculiar, o eluente 4 (tolueno, diclorometano, acetato de etila, ácido fórmico (30:25:45:10, v/v/v/v)) possibilitou a identificação das substâncias marcadoras empregadas para a caracterização do perfil cromatográfico da marcela. Ao analisar o cromatograma sob luz UV 365 nm, antes da revelação com reagente natural A, verificou-se que a quercetina aparece como uma mancha de fluorescência clara. A 3-O-metil-quercetina aparece como uma mancha de coloração marrom, parcialmente sob a mancha referente à quercetina e a luteolina aparece logo abaixo também como uma mancha de coloração marrom (Figura 3.7a). Ao revelar a placa cromatográfica, as manchas referentes a quercetina e a 3-O-metil-quercetina fundem-se, pois ambas desenvolvem coloração alaranjada fluorescente, com uma leve diferença de tonalidade, o que dificulta sua diferenciação. A mancha relativa a luteolina desenvolve coloração amarela fluorescente (Figura 3.7b).



**Figura 3.7:** Análise cromatográfica da matéria-prima vegetal marcela (*Achyrocline satureioides*). Eluente 4. Suporte: gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck). **L:** luteolina. **Q:** quercetina. **3Q:** 3-O-metil-quercetina. **Q<sub>3,7</sub>:** quercetina 3,7-dimetil éter. **E1:** fração acetato de etila. **E2:** extrato metanólico. **E3:** extrato etanólico. **E4:** extrato hidroetanólico 50%. Eluente: tolueno, diclorometano, acetato de etila, ácido fórmico (30:25:45:10, v/v/v/v). **a)** esquema da placa cromatográfica antes da revelação/luz 365 nm; **b)** placa após a revelação com reagente natural A/luz visível.

A quercetina 3,7-dimetil éter foi aplicada com o intuito de tentar identificar a substância que aparece como uma mancha marrom, logo acima da mancha referente a quercetina, antes da revelação. No entanto, verificou-se que a substância marcadora aplicada não corresponde aquela que se pretendia identificar, pois, além de não apresentar o mesmo valor de R<sub>f</sub>, após a revelação, a quercetina 3,7-dimetil éter desenvolve coloração laranja fluorescente, enquanto a mancha observada nas soluções amostras desenvolve coloração amarela fluorescente.

Em suma, de acordo com os testes realizados verificou-se que as melhores condições para a determinação do perfil cromatográfico da marcela foram obtidas com o extrato etanólico (1:20, m/p) no seguinte sistema cromatográfico: suporte: placa de celulose; eluente: clorofórmio, ácido acético glacial, água (50:45:5, v/v/v). revelador: reagente natural A. No entanto, propõe-se como alternativa para análise do extrato etanólico o seguinte sistema cromatográfico: suporte: gel de sílica GF<sub>254</sub>; eluente: tolueno, diclorometano, acetato de etila, ácido fórmico (30:25:45:10, v/v/v/v);

revelador: reagente natural A. Embora não tenha possibilitado a separação das substâncias marcadoras de forma tão acentuada quanto o sistema preconizado na Farmacopéia Brasileira (2001b), permitiu a caracterização do perfil cromatográfico da marcela de forma precisa e reprodutível. Cabe ressaltar que os testes foram realizados também em dias diferentes e em placas de gel de sílica de procedência diferente de modo a confirmar as características observadas e descritas.

## **4 MATERIAIS ESTRANHOS x CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

Consideradas como insumo farmacêutico, as drogas vegetais devem estar inteiramente livres de sinais visíveis de contaminação por fungos e insetos ou qualquer outro tipo de contaminação de origem animal e não devem apresentar odor anormal, descoloração, ou sinais de deterioração. No entanto, nem sempre as drogas vegetais estão totalmente isentas de certas impurezas (WHO, 1998). Muitos produtores desconhecem os cuidados que se deve ter nas diversas etapas para a obtenção de matérias-primas e/ou produtos de qualidade adequada e não contam com a orientação de profissionais capacitados (FARIAS et al, 1985).

Materiais estranhos ou impurezas, em matérias-primas vegetais, são definidos como qualquer material, seja ele de origem vegetal, animal ou mineral, encontrado junto ao farmacógeno que não esteja incluído na definição e descrição da droga vegetal e acima do limite de tolerância especificado na monografia, desde que esses elementos não caracterizem falsificação ou adulteração (HARTKE; MUTSCHLER, 1986).

Para a Farmacopéia Européia (2002) os elementos estranhos são constituídos, no todo ou em partes, pelas seguintes matérias:

- a) partes estranhas: qualquer elemento proveniente da planta de origem que não seja constituinte do fármacógeno;
- b) matérias estranhas: qualquer elemento estranho à planta de origem, seja vegetal, animal ou mineral.

A Farmacopéia Brasileira (2000b) e também a Organização Mundial da Saúde (1998) classificam os materiais estranhos em três grupos:

- a) partes da matéria-prima vegetal ou de outras drogas vegetais, diferentes do farmacógeno e acima do limite especificado, na respectiva monografia.



b) quaisquer organismos, partes ou produtos dos organismos, diferentes daqueles descritos e especificados para o referido material vegetal.

c) material mineral não aderido à matéria-prima vegetal, tais como, terra, areia e pedras.

Materiais estranhos podem estar representados por órgãos da própria planta, diferentes do farmacógeno, tais como restos de caules em flores de camomila, fragmentos de outras plantas, como gramíneas e ervas daninhas, bem como materiais de outra origem, como areia ou terra em raízes e caules, mesmo quando cultivadas e tratadas adequadamente (HARTKE; MUTSCHLER, 1986). Podem ser representados, também, por insetos adultos e suas fases intermediárias, inteiros ou fragmentados, ácaros, pêlos de animais, etc. (CORREIA; RONCADA, 2002).

As drogas vegetais podem, ainda, conter um grande número de fungos e bactérias, geralmente proveniente do solo ou pertencentes à microflora natural de certas plantas (WHO, 1998).

O ataque de microrganismos patogênicos não é comum em drogas vegetais, e embora não causem a deterioração da droga vegetal, certas bactérias patogênicas como *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* podem ser encontradas (EVANS, 1996). Muitas vezes, sua presença está relacionada com o manuseio das matérias-primas, o processo tecnológico empregado ou com o armazenamento e distribuição inadequados (FDA, 1998; WHO, 1998).

Os fungos encontrados em drogas vegetais são geralmente os mesmos encontrados nos produtos alimentícios em más condições de estocagem (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Eurotium*). A presença deles é indicada pela presença de hifas que entrelaçam as partículas de drogas e pelo cheiro característico (EVANS, 1996).

Alguns estudos encontraram índices de contaminação microbiana em desacordo com os padrões de qualidade preconizados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) e por normas internacionalmente aceitas para medicamentos (ALONSO et al, 1994; ZARONI et al, 2000; MARTINS et al, 2001).

De acordo com Andrews e colaboradores (1980) os principais fatores que podem afetar os níveis de contaminação estão relacionados com as condições fisiológicas da planta, a presença de vetores, o microclima e a acessibilidade dos microrganismos ao material vegetal. Além desses, devem ser considerados ainda, a altura do farmacógeno do solo, a qualidade de irrigação da água, a contaminação humana e/ou por animais, o tipo de manufatura a ser empregado, e a possibilidade de difusão de esporos pelo ar (ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980 apud ALONSO et al, 1994), o teor de umidade, temperatura, a iluminação e a presença de oxigênio, pois quando as condições são favoráveis, organismos vivos (bactérias, fungos e insetos) se multiplicam rapidamente, usando as drogas vegetais como fonte de nutrientes (EVANS, 1996).

Outro tipo de contaminação, bastante freqüente em drogas vegetais, está relacionado com a presença de insetos, seus fragmentos e ácaros. Estes podem ser provenientes de drogas vegetais que sofreram ataque de pragas ainda no campo e que foram carregados com o material vegetal (BARBIERI et al, 2001).

Muitos insetos causam danos nas plantas ao se alimentarem ou ao depositarem seus ovos, ou ainda quando funcionam como agentes transmissores de moléstias para as plantas. Um dos danos mais comuns em plantas é o causado por insetos mastigadores, como gafanhotos, besouros e abelhas. Alguns insetos danificam as plantas quando depositam seus ovos, pois durante o processo de metamorfose a planta serve de alimento para as larvas de mariposas e abelhas, por exemplo. Os insetos podem causar, também, danos consideráveis ao se alimentar ou ao construir túneis nas matérias-primas vegetais depois de armazenadas (BORROR; DeLONG, 1988). Além disso, insetos e ácaros ao depositarem suas dejeções sobre as matérias-primas, também são considerados vetores passivos de organismos patógenos, pois facilitam a entrada de bactérias e fungos (CORREA; RONCADA, 2002). As espécies mais importantes deste tipo de praga são as da ordem Lepidóptera (mariposas e borboletas), Coleóptera (besouros) e Artrópoda (ácaros) (BORROR; DeLONG, 1988).

Além das numerosas espécies de insetos que se adaptaram ao habitat das matérias-primas vegetais armazenadas encontram-se também os ácaros. Alguns

são introduzidos a partir do solo e da matéria orgânica de áreas adjacentes, enquanto outros são provenientes de roedores, aves e insetos. Os ácaros encontrados em matérias-primas vegetais armazenadas são em sua maioria ácaros primários, todos incluídos na ordem Acariforme (BORROR; DeLONG, 1988). Além de se alimentarem dos produtos armazenados, os ácaros podem desencadear processos alérgicos em indivíduos susceptíveis (BORROR; DeLONG, 1988; CORREA; RONCADA, 2002).

Plantas medicinais devem apresentar um controle higiênico e sanitário rigoroso, de modo a garantir a boa qualidade dos produtos assim como a integridade do paciente (FARIAS, 2004). No entanto, verifica-se que durante o processo regular de produção (secagem, corte, empacotamento e estocagem) e distribuição, as matérias-primas vegetais não são submetidas a nenhum tipo de controle que possa prevenir o crescimento e a contaminação microbológica (MARTINS et al, 2001). A detecção, prevenção e erradicação das causas da presença de materiais estranhos em drogas vegetais fazem parte das boas práticas de fabricação. Medidas efetivas de prevenção envolvem boa higienização, tanto do material vegetal quanto do local de armazenamento, o controle de estoque eficiente, condições adequadas de armazenamento e transporte (EVANS, 1996).

Quanto à determinação de materiais estranhos em matérias-primas vegetais, as farmacopéias preconizam a determinação de materiais estranhos através da análise visual direta ou com o auxílio de lente de aumento para drogas vegetais. No entanto, quando as drogas vegetais encontram-se pulverizadas, a análise visual torna-se praticamente impossível, sendo então recomendada a análise microscópica.

A análise de amostras pulverizadas é complexa, pois exige o reconhecimento das estruturas microscópicas características e diferenciais para cada espécie e pessoal altamente especializado. Em certos casos, a análise microscópica, além de contribuir para a verificação da autenticidade da amostra, permite inferências a respeito da pureza do material (FARIAS, 2004). No entanto, a quantidade de amostra retirada para a realização das análises microscópicas é bastante pequena, fato importante a ser considerado, em se tratando da determinação de materiais estranhos em drogas vegetais, sejam eles de origem vegetal, animal ou mineral.

Outro detalhe importante está relacionado com a falta de especificações e parâmetros de qualidades a serem obedecidos para a determinação de materiais estranhos em drogas vegetais pulverizadas.

Na área de alimentos, técnicas microanalíticas são muito utilizadas para a determinação de sujidades leves e podem trazer informações importantes sobre a produção, processamento, estocagem e distribuição das matérias-primas vegetais, pois a presença de materiais estranhos está frequentemente associada com a falta de boas práticas de processamento (FDA, 1998).

A metodologia de determinação de sujidades leves foi desenvolvida a partir da observação de que insetos e seus fragmentos, assim como pêlos de roedores, contidos em um meio aquoso flutuavam quando misturados à gasolina. Tais sujidades, devido a presença de uma cutícula lipofílica, são envolvidas pela fase oleosa formando uma película e, desta forma, são arrastados com a fase oleosa para a camada superior, enquanto os tecidos vegetais absorvem água, permanecendo no meio aquoso. A extração e identificação das sujidades leves não pode dar uma relação quantitativa quanto às condições higiênicas sanitárias da empresa ou das matérias-primas. Porém, elas irão mostrar, de forma qualitativa, se houve contaminação, indicando ainda os pontos críticos onde as práticas de sanitização, controle de qualidade da matéria-prima e condições de processamento deverão ser enfatizadas (BARBIERI et al, 2001).

## 4.2 OBJETIVOS

- Avaliar a contaminação por materiais estranhos, através dos métodos farmacognósticos, nas seguintes matérias-primas vegetais: calêndula, funcho, espinheira-santa e maracujá.
- Avaliar a aplicabilidade da utilização de técnicas microanalíticas, assim como padronizar a metodologia analítica para determinação de sujidades leves para as seguintes drogas vegetais pulverizadas: calêndula, funcho, espinheira-santa e maracujá.
- Avaliar a contaminação microbiológica das matérias-primas vegetais em questão.
- Fazer a correlação entre o teor de materiais estranhos nas drogas vegetais inteiras com a determinação de sujidades leves, assim como, com a contaminação microbiológica das amostras pulverizadas.

## 4.3 MATERIAIS

### 4.3.1 Material Vegetal

As matérias-primas analisadas, inflorescências de calêndula, folhas de espinheira-santa, frutos de funcho e partes aéreas de maracujá, foram adquiridas em diferentes estabelecimentos que comercializam produtos naturais e plantas medicinais, localizadas na cidade de Florianópolis. O material foi adquirido a granel, já seco e grosseiramente rasurado, em quantidade suficiente para a realização das análises (cerca de 750 g) (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Amostras das matérias-primas vegetais utilizadas para a determinação de materiais estranhos

A confirmação da identidade botânica foi realizada por meio dos sistemas cromatográficos descritos no capítulo 3 e de análise microscópica realizada pela Professora Lílian Auler Mentz, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 4.3.2 Aparelhos e equipamentos

Moinho de facas (Maqmont); Microscópio estereoscópico (Metrimplex / PZO-Labimex); Tamis (mesh 230) (a bronzinox); Frasco armadilha (Wildman trap flash) de 1 L; Estufa (Fanem LTDA); Incubadora (Quimis – BOD B-315D); Capela de fluxo laminar (TROX / Technik).

### 4.3.3 Reagentes, solventes e soluções

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico, de procedência Vetec, Nuclear, Prontolab, Cinética Química, Sigma. Estes foram: água destilada; etanol 50%; isopropanol 40%; polissorbato 80 (Synth); EDTA sódico (Nuclear); óleo mineral (Rioquímica); n-hexano comercial (Nuclear); óleo de flutuação (óleo mineral: n-hexano, 90:10. v/v); solução sequestrante (50 mL de solução polissorbato 80 0,03% + 50 mL de solução EDTA sódico 0,03% + 200 mL de isopropanol 40%); tampão bifosfato de potássio (Vetec - 148).

### Meios de cultura

Caldo caseína-soja (Casoy) (Oxoid - CM129); caldo lactosado simples (Oxoid - CM137); caldo selenito de cistina (Difco - 0687-17); caldo bile verde brilhante tetratoato (Difco - 210430); ágar Batata-dextrose (Difco - 245631); ágar Bayer-Parker (BP) (Difco - 276840); ágar cetrimida (Merck - 1.10130); ágar eosina-azul de metileno (EMB) (Merck - 1.01347); ágar ferro-tríplo açúcar (Acumedia - 7206A); ágar MacConkey (Oxoid - CM115); ágar Salmonella-Shigela (SS) (Merck - 1.07667.0500); ágar verde bile brilhante (VRB) (Difco - 228530)

## **4.4 MÉTODOS**

### **4.4.1 Determinação de materiais estranhos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b)**

Por quarteamento, realizou-se a tomada de ensaio preconizada na metodologia (250 g). O material foi espalhado sobre uma superfície plana devidamente higienizada. Os materiais estranhos foram separados manualmente e a identificação foi realizada através de inspeção visual direta, e em seguida com o auxílio da lupa e, empregando uma lente de aumento (6X). Os materiais estranhos encontrados foram pesados, e o percentual foi determinado em peso.

As determinações de materiais estranhos para as matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá foram realizadas em triplicata (3 x 250 g).

### **4.4.2 Pesquisa de sujidades leves (AOAC, 2000)**

Após a determinação de materiais estranhos nas drogas vegetais citadas anteriormente, as replicatas foram reunidas, juntamente com os materiais estranhos e todo o material foi pulverizado em moinhos de facas.

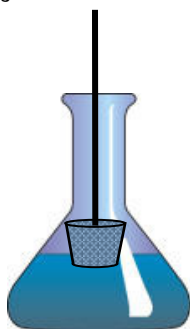
As determinações de sujidades leves nas matérias-primas vegetais em questão foram desenvolvidas segundo os métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995) 975.48b e 981.18, para a determinação de sujidades leves em especiarias e condimentos sem metodologia específica e em chá mate, chá preto, erva-mate, respectivamente.



#### 4.4.2.1 Método oficial da AOAC 975.48b

##### Pré-tratamento da amostra

A amostra (10 g) foi transferida para frasco armadilha de 1 L (Figura 4.2), após a adição de cerca de 150 mL de água, o material foi aquecido até ebulição e fervido, durante 15 min, com agitação.



**Figura 4.2:** Frasco armadilha de Wildman

##### Separação da sujidades

O frasco armadilha foi resfriado a uma temperatura de aproximadamente 20°C em água corrente. Adicionaram-se 25 mL de heptano, seguido de agitação em agitador magnético por 5 minutos. O frasco armadilha foi completado com água e deixado em repouso por 30 min. Prendeu-se a rolha no gargalo e transferiu-se o líquido sobrenadante para o funil de Büchner com o papel filtro quadriculado, lavando-se as paredes do gargalo com água. Adicionaram-se novamente 25 mL de heptano, repetindo-se o procedimento anterior.

O papel filtro quadriculado foi examinado ao microscópio estereoscópico, com aumento de 4X.

#### **4.4.2.2 Método oficial da AOAC 981.18**

##### **Pré-tratamento da amostra**

Pesaram-se 10 g da amostra em bécker de 800 mL, e, após a adição de 300 mL de água, o material foi aquecido até a ebulição e fervido lentamente durante 6 minutos, com agitação.

##### **Separação das sujidades**

Transferiu-se o material do bécker para o tamis (230) e lavou-se com fluxo de água airado até que a água de lavagem saísse limpa. Transferiu-se o resíduo quantitativamente com isopropanol 40% para frasco armadilha de 2 litros, lavando as paredes do becker e completando o volume com isopropanol 40% até cerca de 900 mL. Adicionaram-se 25 mL de óleo de flutuação. Agitou-se com bastão contendo a rolha, em movimentos de cima para baixo e em movimentos circulares durante 2 – 3 minutos. Deixou-se em repouso durante 2 – 3 minutos. Adicionaram-se 300 mL de solução seqüestrante e agitou-se novamente em movimentos de cima para baixo e em forma de redemoinho durante 1 minuto. Completou-se lentamente o volume do frasco com isopropanol 40%, deixando-se o líquido escorrer pelo bastão de agitação, enquanto a rolha era mantida acima de líquido. Agitou-se com movimentos circulares para ressuspender o material. Deixou-se em repouso o tempo necessário para a separação completa das duas fases (todo o material vegetal decantar no fundo do frasco e as gotículas de óleo emergirem para a superfície). Prendeu-se a rolha no gargalo e transferiu-se o líquido sobrenadante para o funil de Büchner com o papel filtro quadriculado, lavando-se as paredes do gargalo com isopropanol 40%. Adicionaram-se, novamente, 25 mL de óleo de flutuação, repetindo-se o procedimento anterior.

O papel filtro quadriculado foi examinado ao microscópio estereoscópico, com aumento de 4 vezes.

### **Alterações na metodologia**

Algumas modificações foram testadas visando otimizar os resultados obtidos para as drogas vegetais analisadas, quando os resultados observados segundo as metodologias oficiais não foram satisfatórios. Estas modificações estão relacionadas com a quantidade de amostra utilizada, com o pré-tratamento da amostra, o líquido de flutuação e a concentração do tensoativo e do agente sequestrante empregado, as quais estão apresentadas na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Alterações nas metodologias para a determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

	Calêndula	Espinheira-santa	Funcho	Maracujá
<b>Quantidade de amostra</b>				
10,0 gramas	X	X	X	X
5,0 gramas	X			X
<b>Pré-tratamento da amostra</b>				
Água aquecida + ebulição com agitação por 15 min	X	X	X	X
Água aquecida + ebulição com agitação por 6 min	X	X	X	X
Etanol 50% + ebulição com agitação por 10 min	X	X	X	X
<b>Separação das sujidades – Parte I</b>				
Água	X	X	X	X
Isopropanol 40 %	X	X	X	X
Etanol 60 % (BARBIERI et al., 2001).	X	X	X	X
Isopropanol 30 %	X			X
Isopropanol 50 %	X			X
<b>Separação das sujidades – Parte II</b>				
Sem a adição de tensoativo e agente sequestrante	X	X	X	X
Solução sequestrante (Solução polissorbato 80 0,03% + Solução Na <sub>4</sub> EDTA 0,03 %)*	X	X	X	X
Solução de polissorbato 80 0,05%*	X			X
Solução de polissorbato 80 1,00%*	X			X
Solução de polissorbato 80 2,00%*	X			X
Solução de polissorbato 80 4,00%*	X			X
Solução de Na <sub>4</sub> EDTA 0,05%*	X			X
Solução de Na <sub>4</sub> EDTA 0,01%*	X			
Sem solução de Na <sub>4</sub> EDTA	X			X
<b>Isolamento – Parte III</b>				
Óleo de flutuação (óleo mineral + hexano, 90:10, v/v)	X	X	X	X
Hexano	X			X
Óleo mineral	X			X

\* concentração final no frasco armadilha (1 L).

Após a padronização da metodologia para cada uma das matérias-primas vegetais analisadas, as análises propriamente ditas foram realizadas em triplicata. Para a contagem e a identificação dos insetos e seus fragmentos isolados sistematizou-se a realização da análise em uma área de 4 cm<sup>2</sup> localizada na parte central do patel filtro.

### **4.4.3 Pesquisa da contaminação microbiológica**

A pesquisa da contaminação microbiológica foi realizada no laboratório de microbiologia do Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina<sup>3</sup>.

#### **4.4.3.1 Material vegetal**

A partir do mesmo lote de matérias primas-vegetais utilizadas para a determinação das sujidades leves foram retiradas amostras para a determinação da contaminação microbiológica.

#### **Pré-Tratamento do material a ser examinado (WHO, 1998)**

Foram suspensos 10 g de cada amostra em 90 mL de tampão cloreto de sódio-peptona, ajustando-se o pH para 7,0, quando necessário. A amostra tratada correspondeu a diluição  $10^{-1}$ .

---

<sup>3</sup> Realizado em colaboração com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa.

#### **4.4.3.2 Determinação do número de microrganismos viáveis (WHO, 1998)**

As amostras previamente tratadas foram diluídas em séries decimais, até  $10^{-4}$ , empregando-se a mesma solução utilizada no tratamento, de modo a obter contagens inferiores a 300 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) para a contagem de bactérias aeróbias e 100 UFC para a contagem de bolores e leveduras.

##### **Contagem de bactérias aeróbias (WHO, 1998)**

Para a contagem de bactérias aeróbias, cada diluição foi plaqueada em duplicata, empregando-se a técnica oficial de semeadura em profundidade no ágar caseína-soja. A incubação foi feita a 30-35 °C, por 5 dias.

##### **Contagem de bolores e leveduras (WHO, 1998)**

Para a contagem de bolores e leveduras, a técnica empregada foi a da semeadura em profundidade no ágar batata-dextrose (PDA), acrescido de solução de ácido tartárico 10% até a obtenção de pH 3,0-3,5.

Cada diluição foi plaqueada em duplicata e incubada a 20-25 °C, por 5 dias.

#### **4.4.4 Pesquisa de patógenos específicos**

##### **4.4.4.1 Pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella ssp***

###### **Pré-tratamento do material a ser examinado (WHO, 1998)**

Para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella ssp* foram transferidos 10 g do material para 90 mL de caldo lactosado simples (CLS). O material pré-tratado foi homogeneizado e incubado a 35-37°C por 24 h.

###### **Pesquisa de *Escherichia coli* (WHO, 1998)**

Para a pesquisa de *Escherichia coli* foi feito o repique de cada uma das amostras pré-tratadas diretamente em placas de Petri contendo ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 43-45°C por 24 horas.

###### **Pesquisa de *Salmonella ssp* (WHO, 1998)**

Para a pesquisa de *Salmonella*, transferiram-se 10 g da cultura enriquecida em caldo lactosado para 90 mL de caldo bile verde brilhante tetratoato, e inoculou-se a 42-43°C por 24 horas. Após a incubação foram preparadas subculturas em placas contendo ágar verde bile brilhante e ágar salmonela-shigela, usando a técnica de estriamento em superfície. As placas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas.

Como teste secundário, realizou-se o repique em ágar ferro-tríplo açúcar das colônias suspeitas que cresceram em um dos dois meios de cultura utilizados anteriormente, usando a técnica de inoculação em profundidade. Os tubos foram incubados a 35-37°C por 24 horas.

#### 4.4.4.2 Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

##### **Pré-tratamento do material a ser examinado (USP, XXVI)**

Para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* transferiram-se 10 g do material para 90 mL de caldo caseína-soja (Casoy). O material pré-tratado foi homogeneizado e incubado a 35-37°C por 24 h.

##### **Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* (USP, XXVI)**

Após o enriquecimento, realizou-se o repique, com o auxílio de alça de platina, para placas contendo ágar cetrimida, usando a técnica de estriamento em superfície. As subculturas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas.

##### **Pesquisa de *Staphylococcus aureus* (USP, XXVI)**

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* após o enriquecimento do material em caldo Casoy, transferiram-se, com o auxílio de alça de platina, para placa contendo ágar Bayer-Parker, utilizando-se a técnica de estriamento em superfície. As placas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas.

A identificação dos microrganismos acima citados, quando detectados, foi realizada através de provas bioquímicas e sorológicas, segundo a preconização da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998).

- a) Confirmação de *Pseudomonas aeruginosa*: teste da oxidase e pigmento
- b) Confirmação de *Staphylococcus aureus*: teste da coagulase



- c) Confirmação de *Salmonella-Shigela*: inoculação em tubos contendo ágar ferro-três açúcares.
- d) Confirmação de *Escherichia coli*: inoculação em ágar eosina-azul de metileno e teste de Indol.

## **4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.5.1 Determinação de materiais estranhos**

A determinação de materiais estranhos constitui um quesito farmacopéico para o controle de qualidade de drogas vegetais. A quantidade de tomada para o ensaio foi retirada por amostragem, empregando-se a técnica de quarteamento. A Farmacopéia Brasileira (2000b) preconiza a realização da determinação de materiais estranhos em matérias-primas vegetais através do método de catação direta, inicialmente a olho nu e em seguida com o auxílio de lente de aumento. O material separado foi pesado e a percentagem de materiais estranhos foi calculada com base no peso da tomada de ensaio. Os resultados obtidos para a determinação de materiais estranhos nas drogas vegetais analisadas encontram-se na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Percentuais de materiais estranhos encontrados nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

<b>Calêndula</b>			
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
Massa da amostra	251,5	248,7	263,1
Massa de materiais estranhos	4,7	5,1	5,6
% de materiais estranhos	1,8	2,1	2,1
Média ± DP (CV %)	2,0 ± 0,12 (5,90)		
<b>Espinheira-santa</b>			
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
Massa da amostra	248,9	250,8	266,8
Massa de materiais estranhos	113,5	110,6	136,1
% de materiais estranhos	45,6	44,1	51,0
Média ± DP (CV %)	46,9 ± 2,96 (6,31)		
<b>Funcho</b>			
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
Massa da amostra	249,3	255,1	266,5
Massa de materiais estranhos	8,6	8,2	9,0
% de materiais estranhos	3,4	3,2	3,4
Média ± DP (CV %)	3,3 ± 0,10 (3,13)		
<b>Maracujá</b>			
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
Massa da amostra	258,8	253,0	248,6
Massa de materiais estranhos	0,7	0,8	0,7
% de materiais estranhos	0,3	0,3	0,3
Média ± DP (CV %)	0,30 ± 0,30 (8,09)		

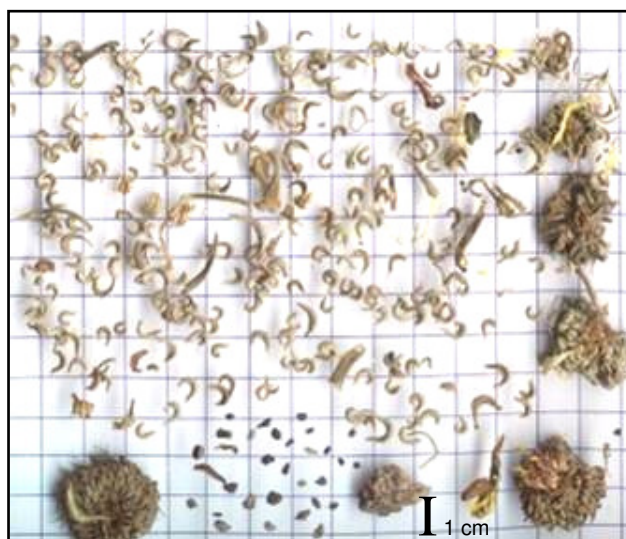
Entre as drogas vegetais analisadas, a espinheira-santa foi a que apresentou o maior percentual de materiais estranhos (47 %), valor muito acima dos 2 % preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2002), o que pode ser caracterizado como adulteração. Entre os materiais estranhos, foram encontrados galhos e folhas fungadas, além de resíduos de terra, pedras, líquens, teias de aranha, insetos e pêlos (Figura 4.3).

I 1 cm



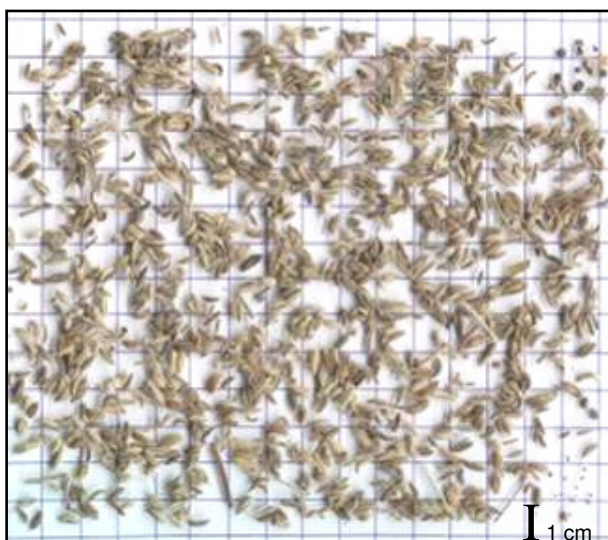
**Figura 4.3:** Materiais estranhos encontrados nas amostras de espinheira-santa.

O percentual médio de materiais estranhos encontrados nas amostras de calêndula foi de 2 %, valor abaixo de limite máximo especificado na Farmacopéia Brasileira (2001a) que é de 3 %. Nas amostras de calêndula foram encontrados vários frutos, insetos, larvas secas, torrões de barro, além de resíduos de carvão e barro (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Matérias estranhos encontrados nas amostras de calêndula.

Nas amostras de funcho o percentual médio de materiais estranhos encontrado foi de 3 %, no entanto de acordo com o especificado na Farmacopéia Brasileira (2000b) o percentual máximo de materiais estranhos permitidos nessa droga vegetal é de apenas 2%. Entre os materiais estranhos foram encontrados muitos frutos fungados e com bichos, além de material roído e vários insetos e resíduos de pedras (Figura 4.5).



**Figura 4.5:** Matérias estranhas encontradas nas amostras de funcho.

Entre as matérias-primas analisadas, o maracujá foi o que apresentou o menor percentual de materiais estranhos (0,3%), valor bem abaixo do percentual máximo preconizado na Farmacopéia Européia (2002), para a espécie *Passiflora incarnata* (3,0%). Nas amostras de maracujá foram encontradas somente algumas penas, teia de aranha e uma ou outra pedra (Figura 4.6).



**Figura 4.6:** Matérias estranhas encontrados nas partes aéreas do maracujá.

#### **4.5.2 Determinação de sujidades leves**

Todas as análises foram realizadas em frasco armadilha de um litro, mantendo-se as mesmas proporções utilizadas no método oficial, quando da realização das análises em frasco armadilha de 2 (dois) litros.

A determinação de sujidades leves segundo o método oficial da AOAC 975.48b mostrou-se inapropriado para as quatro matérias-primas vegetais analisadas. Ao realizar as análises, observou-se que grande parte do material vegetal emergia para o meio oleoso, impedindo assim, o isolamento e a realização da análise do material ao microscópio estereoscópico.

Quanto à determinação de sujidades leves, os resultados obtidos através do método oficial da AOAC 981.18 mostraram-se bastante satisfatórios para o funcho e para a espinheira-santa. No entanto, observou-se que parte do material vegetal continuava emergindo para a interface dos dois meios, o que dificultava sua análise posterior. Visando otimizar a realização das análises, várias modificações foram testadas.

A primeira adaptação está relacionada com a quantidade de amostra utilizada para a realização das análises. Enquanto o método oficial preconiza a utilização de 10,0 g de amostras para frasco armadilha de 2 litros, a determinação de sujidades

leves, no funcho e na espinheira-santa, foi realizada em frasco armadilha de 1 litro e mantendo-se os 10 g de amostra. A segunda modificação refere-se ao pré-tratamento da amostra com solução alcoólica 50%, seguido de um período de 10 minutos de ebulição com agitação. Desta forma, proporcionou-se uma maior umidificação da amostra, e com isso observou-se que apenas uma quantidade irrisória de amostra continuou emergindo para a interface dos dois meios. A última alteração está relacionada com a utilização de óleo mineral puro ao invés do chamado líquido de flutuação. Com os testes realizados verificou-se que, ao utilizar o heptano junto ao óleo mineral, a viscosidade da fase oleosa diminuía e com isso a diferença entre a tensão superficial dos dois meios tornava-se menor, facilitando assim a ascensão de partículas que não se encontravam completamente umidificadas, para evitar isso, optou-se pela utilização do óleo mineral puro.

Quanto à determinação de sujidades leves nas matérias-primas calêndula e maracujá, nem o método oficial da AOAC, nem as alterações realizadas para a espinheira-santa e para o funcho mostraram-se apropriadas. Para ambas matérias-primas vegetais observou-se a formação de uma emulsão na interface dos dois meios. Nesta emulsão, verificou-se ainda que uma pequena quantidade de amostra ficou retida, dificultando a separação das sujidades. Na tentativa de solucionar o problema, novos testes foram realizados (Tabela 4.1).

Após vários testes, padronizou-se a metodologia que apresentou melhor desempenho. Para a determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais calêndula e maracujá, foram realizadas as seguintes alterações: quantidade de amostra: 5 g; pré-tratamento da amostra com solução etanólica 50%, seguido de 10 minutos de ebulição; concentração da solução de polissorbato 80 foi aumentada para 2,0% e a concentração do agente seqüestrante foi diminuída para 0,01%, de forma a aumentar a diferença entre a tensão superficial dos dois meios, assim como a molhabilidade do meio aquoso. Como óleo de flutuação foi utilizado óleo mineral puro.

A padronização das metodologias para a determinação de sujidades leves, nas quatro matérias-primas em questão, é apresentada na tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Padronização das metodologias para determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

<b>Matérias-primas</b>	<b>Calêndula</b>	<b>Espinheira-santa</b>	<b>Funcho</b>	<b>Maracujá</b>
<b>Quantidade de amostra</b>	5,0 g	10,0 g	10,0 g	5,0 g
<b>Pré-tratamento da amostra</b>	Sol. Alcoólica 50% + 10 min. ebulição	Sol. Alcoólica 50% + 10 min. ebulição	Sol. Alcoólica 50% + 10 min. ebulição	Sol. Alcoólica 50% + 10 min. ebulição
<b>ISOLAMENTO</b>				
<b>Parte I</b>	Isopropanol 40 %	Isopropanol 40%	Isopropanol 40%	Isopropanol 40 %
<b>Parte II</b>	Sol. Polissorabato 80 2,0% Sol. Na <sub>4</sub> EDTA 0,01% *	Solução seqüestrante	Solução seqüestrante	Sol. Polissorabato 80 2,0% Sol. Na <sub>4</sub> EDTA 0,01% *
<b>Parte III</b>	Óleo mineral	Óleo mineral	Óleo mineral	Óleo mineral

\* Concentração final no frasco armadilha de 1 litro.

As sujidades leves isoladas e retidas no papel de filtro foram identificadas e quantificadas ao microscópio estereoscópico, com aumento de 4 vezes. A contagem e a identificação dos fragmentos de insetos foi realizada pelo Professor Dr. Afonso Inácio Orth, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina<sup>4</sup>. Na tabela 4.4 estão apresentados o somatório dos tipos e as quantidades médias das sujidades leves isoladas encontradas nas matérias-primas calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá. Ressalta-SE que as análises foram realizados em triplicata e a área total analisada corresponde a 12 cm<sup>2</sup>.

<sup>4</sup> Agradeço ao Professor Dr. Afonso Inácio Orth pela contagem e identificação dos fragmentos de insetos isolados a partir da determinação de sujidades leves nas matérias-primas vegetais em questão.



**Tabela 4.4:** Somatório dos tipos e quantidades de sujidades leves isoladas nas matérias-primas vegetais calêndula (A), espinheira-santa (B), funcho (C) e maracujá (D) .

Matérias estranhas	Matérias-primas analisadas			
	A	B	C	D
<b>Tipos</b>	<b>Quantidades</b>			
<b>Inseto</b>	8	3	1	1
<b>Larva</b>	0	0	0	0
<b>Exúvia</b>	0	24	0	2
<b>Ovo</b>	0	0	0	0
<b>Fragmento de inseto</b>	5	29	1029	15
<b>Ácaros</b>	0	0	0	0
<b>Pêlo de roedor</b>	0	0	0	0
<b>Total</b>	13	56	1030	18

#### 4.5.3 Determinação de microrganismos viáveis totais e patógenos específicos

A determinação dos limites de tolerabilidade para a determinação da contaminação microbiológica em matérias-primas vegetais é discutida em vários países, sendo freqüentemente aceitos os valores estabelecidos para alimentos (FARIAS, 2004). A Farmacopéia Brasileira (1988b), diferente de outras farmacopéias, não estabelece limites específicos para drogas vegetais aplicáveis à contaminação de microrganismos viáveis, sendo aceitos os valores preconizados para produtos que não necessitam cumprir com testes de esterilidade. A Organização Mundial da Saúde estabelece critérios diferentes para as drogas vegetais segundo o tratamento a que será submetido o material (WHO, 1998).

Para drogas vegetais não tratadas, coletadas em condições higiênicas e que serão processadas, incluindo procedimentos de descontaminação química ou física, como por exemplo, aquecimento, extração com álcool, aceita-se como valores máximos  $10^4$  UFC/g para *Escherichia coli* e  $10^5$  UFC/g para fungos e leveduras. Para matérias-primas que serão submetidas a tratamento que pode vir a reduzir a carga microbiana, antes do uso, como a adição de água fervente para a preparação de

infusões, os limites máximos aceitáveis são:  $10^7$  UFC/g para microorganismos aeróbios,  $10^4$  UFC/g para fungos e leveduras;  $10^2$  UFC/g para *Escherichia coli*;  $10^4$  UFC/g para outras enterobactérias; e ausência de *Salmonella*. Já para plantas destinadas ao uso interno, os limites máximos aceitáveis são:  $10^5$  UFC/g para microorganismos aeróbios,  $10^3$  UFC/g para fungos e leveduras; 10 UFC/g para *Escherichia coli*;  $10^3$  UFC/g para outras enterobactérias; e ausência de *Salmonella* (WHO, 1998). A tabela 4.5 apresenta as quatro matérias-primas analisadas e os resultados da análise microbiológica, a qual compreende contagem de microrganismos aeróbios totais, contagem de bolores e leveduras e a pesquisa de patógenos específicos (*Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*).

**Tabela 4.5:** Resultados da análise microbiológica das matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

Nome popular	Contagem de aeróbios totais UFC/g	Contagem de bolores e leveduras UFC/g	PEc **	PSal **	PSau **	PPae **
<b>Calêndula</b>	$3,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^1$	A	A	A	A
<b>Espinheira-santa</b>	$3,5 \times 10^6$	$1,05 \times 10^3$	A	A	A	A
<b>Funcho</b>	$6,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	A	A	A	A
<b>Maracujá</b>	$1,14 \times 10^8$	$1,4 \times 10^4$	A	A	A	A

\*\* PEc = Pesquisa de *Escherichia coli*; PSal = Pesquisa *Salmonella sp*; PSau = Pesquisa de *Staphylococcus aureus*; PPae = Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*; P = presença e A = ausência.

Os níveis de contaminação por microrganismos aeróbios totais encontrados variaram de  $3,2 \times 10^5$  UFC/g a  $1,14 \times 10^8$  UFC/g nas drogas vegetais analisadas. Entre elas, a espinheira-santa e o maracujá apresentaram níveis de contaminação superiores ao limite preconizado para uso interno ( $10^5$  UFC/g), mas, somente o maracujá apresentou níveis de contaminação acima do especificado para o uso na forma de chás e infusões ( $10^7$  UFC/g).

A contaminação por bolores e leveduras das drogas vegetais analisadas variou de  $6,0 \times 10^1$  a  $1,4 \times 10^4$  UFC/g. De acordo com as especificações da Organização Mundial da Saúde (1998), a espinheira-santa e a calêndula

apresentaram níveis de contaminação inferiores ao preconizado para o uso interno ( $10^3$ ), já o funcho e o maracujá apresentaram níveis de contaminação aceitáveis para o uso na forma de chás e infusões ( $10^4$  UFC/g).

Na pesquisa de bolores e leveduras, o funcho chamou a atenção, por apresentar desenvolvimento de colônias somente na diluição  $10^{-4}$ , fato que pode estar relacionado com a presença de atividade antifúngica, embora não tenham sido encontrados trabalhos relacionados com a atividade antifúngica para esta espécie.

Nas quatro matérias-primas vegetais analisadas não foi detectada a presença de patógenos específicos. Durante a pesquisa de *Escherichia coli* houve o crescimento de algumas colônias, no entanto estas não foram identificadas. O teste bioquímico confirmou apenas que não se tratava de *Escherichia coli*. O crescimento destas colônias pode estar relacionado com a presença de outras enterobactérias e bacilos Gram-negativos. Segundo Araújo e Ohara (2000) *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp* e *Citrobacter sp.* são comuns em matérias-primas vegetais, uma vez que estão relacionadas ao meio ambiente da plantas, não sendo necessariamente de origem fecal.

Comparando-se os resultados obtidos para a determinação de materiais estranhos, sujidades leves e a contaminação microbiológica, não foi possível estabelecer uma correlação, devido a não observação de uma mesma tendência nas matérias-primas vegetais analisadas. No entanto, tais resultados chamam a atenção para a qualidade das matérias-primas vegetais comercializadas em lojas de produtos naturais. Verificou-se também que, para garantir a qualidade da matéria-prima vegetal, a realização de uma determinada análise não descarta a necessidade de realização das demais. Para a matéria-prima vegetal maracujá, os altos níveis de contaminação microbiológicas observados estavam impróprios até para o consumo na forma de infusões, no entanto, na determinação de materiais estranhos as mesmas amostras foram as que apresentaram uma menor percentagem de materiais estranhos. Já para a matéria-prima vegetal funcho, os resultados obtidos para a determinação de materiais estranhos e da contaminação microbiológica estavam de acordo com as especificações, no entanto, através da determinação de sujidades leves verificou-se que a droga vegetal estava infestada por insetos.

Segundo Zaroni e colaboradores (2004), as matérias-primas vegetais oriundas de solo adubado organicamente, apresentam maior índice de contaminação por microrganismos aeróbios, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Ainda segundo os autores, a baixa qualidade das drogas vegetais encontradas no comércio, nem sempre se deve a descuidos na comercialização, e a elevada contaminação pode ser proveniente das inúmeras etapas do processo produtivo.

Na literatura são encontrados vários trabalhos de verificação da qualidade de amostras comerciais, constatando, principalmente problemas de pureza. Entre estes, destacam-se a contaminação microbiológica em plantas medicinais (ALONSO et al, 1994; MARTINS et al, 2001; ZARONI et al, 2004) e em medicamentos fitoterápicos sob forma sólida (FISCHER; OHARA; SAITO, 1993); a presença de fungos em drogas vegetais durante a estocagem (EFUNTOYE, 1997); a presença de insetos em 63,3 % das amostras de camomila provenientes em empresas e comercializadas em farmácias de Belo Horizonte (BRANDÃO; FREIRE; VIANNA-SOARES, 1998). Estes dados exemplificam a importância da realização de ensaios de pureza, independentes da procedência do material. Também cabe ressaltar a ausência de especificações na literatura para os limites de aceitação desses contaminantes.

## 5 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EM MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS

### 5.1 INTRODUÇÃO

O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2004). Entre os métodos analíticos oficiais para determinação de água em matérias-primas vegetais, o método gravimétrico em estufa é o mais comum, seguido do método de destilação azeotrópica, preconizado para a determinação de água em drogas vegetais ricas em óleos voláteis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

Os métodos de secagem em estufa determinam não somente a perda de água, como também dos demais constituintes voláteis, que são arrastados juntamente com a água (ISENGARD; FÄRBER, 1999; FARIAS, 2004). Além disso, apresentam problemas quanto à reprodutibilidade dos resultados, pois variações significativas podem ser observadas quando uma mesma amostra é analisada em laboratórios diferentes e sob condições climáticas variadas, principalmente, em relação à umidade relativa do ar (ISENGARD et al, 2001).

A Farmacopéia Brasileira (2000b) preconiza a determinação de água para matérias-primas vegetais no item V.4.2.3 “Determinação de água em drogas vegetais”, onde, além dos métodos citados anteriormente (gravimétrico e azeotrópico), indica o método volumétrico (Karl Fischer), e menciona que o método gravimétrico é tecnicamente o mais simples e rápido, mas não deve ser aplicado para matérias-primas vegetais que contenham outras substâncias voláteis além da água. A Farmacopéia menciona, ainda, que o método deve ser selecionado de acordo com a respectiva monografia; entretanto, nas monografias existentes não há especificação de qual dessas metodologias deve ser empregada para a obtenção do valor de referência estabelecido.

Em relação ao método gravimétrico, a Farmacopéia Brasileira (1988a) preconiza, ainda, nos métodos físicos e físico-químicos, a “Determinação da perda por dessecação”. As duas metodologias de secagem em estufa diferem quanto aos critérios de análise. Enquanto a “Determinação de água em drogas vegetais”

preconiza a secagem em estufa de 2,0 a 5,0 g da amostra, exatamente pesados, por 5 h, a 100-105°C, e considera a análise concluída quando a diferença entre duas pesagens consecutivas for menor do que 5 mg (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b), a “Determinação da perda por dessecação” preconiza a secagem em estufa de 1,0 g da amostra, por 2h, a 100-105°C, mas só considera a análise concluída quando a amostra atingir o peso constante, ou seja, quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não diferir em mais de 0,5 mg por grama da amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988).

Apesar da existência de metodologias oficiais, atualmente, estudos estão sendo realizados sobre o uso de balanças acopladas a sistemas de secagem por radiação infravermelha (analisador de umidade) para a determinação de água, tanto na área de alimentos, quanto na área farmacêutica (BERNTSSON, ZACKRISSON, ÖSTLING, 1997; ISENGARD; FÄRBER, 1999; ISENGARD et al, 2001; DE CARO, AICHERT, WALTER, 2001; ISENGARD; PRÄGER, 2003), o que é explicável em função do longo período de tempo requerido para a realização das análises através das técnicas clássicas.

O princípio do aquecimento por radiação infravermelha é a transformação da energia radioativa em energia cinética, com liberação de energia térmica. Em contraste com a transferência de calor por convecção, na secagem em estufa, a energia térmica fornece quantidade de calor suficiente para que a liberação das moléculas de água ocorra mais rapidamente. Cabe ressaltar que, tal como na secagem em estufa, a medida da perda de massa inclui não somente a água (ISENGARD; PRÄGER, 2003). No entanto, há poucos estudos sistemáticos sobre o uso desta técnica aplicada a matérias-primas vegetais, pois dependendo do aparelho utilizado para a determinação de água, diferentes programações podem ser feitas e os resultados das análises podem variar (ISENGARD,1995; ISENGARD; FÄRBER, 1999). Diante disso, faz-se necessário validar a metodologia de determinação de água através de analisador de umidade, de acordo com as condições de secagem estabelecidas.

## 5.2 OBJETIVOS

- Comparar a aplicabilidade das seguintes metodologias farmacopéicas: “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação da perda por dessecação” e “Determinação de água por destilação azeotrópica” para as seguintes matérias-primas vegetais: calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.
- Validar a metodologia de determinação de água em analisador de umidade para essas mesmas plantas.

## 5.3 MATERIAIS

### 5.3.1 Material vegetal

Conforme descrito no item 3.3.1 do capítulo 3 – Caracterização por cromatografia em camada delgada.

Os materiais vegetais foram tamisados para viabilizar a obtenção das granulometrias sugeridas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998): *Calendula officinalis* (500), *Foeniculum vulgare* (710) e *Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata* (350). Os mesmos foram acondicionados em recipientes de vidro, devidamente fechados, armazenados em ambiente com temperatura controlada (18°C) e protegidos da luz.

### 5.3.2 Equipamentos

Estufa (Quimis – 317B212), balança analítica (Gibertin – E42S-B), aparelho de destilação azeotrópica; Analisador de umidade (Ohaus – MB45); Analisador de umidade (Mettler Toledo – HB43).

### 5.3.3 Reagentes, soluções e substâncias reagentes

Tolueno (Nuclear).



## 5.4 MÉTODOS

### 5.4.1 Determinação de água em drogas vegetais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b)

Em pesa-filtros previamente dessecados, pesaram-se exatamente cerca de 3,0 g de cada uma das amostras, colocou-se em estufa a 100-105°C por 5 horas. Após a secagem, deixou-se esfriar por 30 minutos em dessecador, e pesou-se a seguir. Os pesa-filtros foram recolocados na estufa por mais 30 minutos, e este procedimento foi repetido até obter-se uma diferença menor do que 5 mg entre duas pesagens sucessivas,

Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (DP) de oito determinações, em percentagens sobre a quantidade de droga pesada.

### 5.4.2 Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988a)

Em pesa-filtros previamente dessecados, pesou-se exatamente cerca de 1,0 g de cada uma das amostras, colocou-se em estufa a 100-105°C por 2 horas. Após a secagem, deixou-se esfriar por 30 minutos em dessecador, e pesou-se a seguir. Os pesa-filtros foram recolocados na estufa por mais 30 minutos, e este procedimento foi repetido até obter-se peso constante.

Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (DP) de oito determinações, em percentagens sobre a quantidade de droga pesada.

### **5.4.3 Determinação de água por destilação azeotrópica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988a)**

Inicialmente, introduziu-se 200,0 mL de tolueno e cerca de 2,0 mL de água no balão de fundo redondo. A seguir, destilou-se por duas horas, resfriou-se e, após 30 minutos, o líquido foi transferido para tubo de centrífuga graduado e centrifugado para a separação das fases. O volume de água destilado foi medido.

Após a destilação do tolueno, adicionaram-se 20,0 g de amostra, aqueceu-se moderadamente o balão contendo o tolueno e amostra durante 15 minutos. Quando o tolueno começou a destilar, regulou-se o aquecimento para que estilasse cerca de 2 gotas por segundo. Depois que praticamente toda água foi destilada, aumentou-se a velocidade de destilação para cerca de 4 gotas por segundo, por mais 10 minutos. Removeu-se a fonte de aquecimento e, após o resfriamento, o líquido foi transferido para os respectivos tubos de centrífuga. O volume de água da amostra foi obtido através da diferença dos volumes final e inicial. Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (DP) de seis determinações, em percentagem.

### **5.4.4 Determinação de água através de analisador de umidade**

A determinação de água em analisador de umidade foi realizada em dois laboratórios (Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Santa Catarina e Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina – LAFESC).

No Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Santa Catarina, as análises foram realizadas em analisador de umidade da marca Ohaus, modelo MB 45 (EUA). No Laboratório Farmacêutico de Estado de Santa Catarina, as análises foram realizadas em analisador de umidade da marca Mettler Toledo, modelo HB 43 (Suíça).

Em ambos, a fonte de aquecimento é lâmpada de halogênio (400 W) e a sensibilidade da balança é de 0,001 g. Os parâmetros de análise empregados foram: a) massa das amostras: 1,000 g; b) temperatura de análise: 105°C; c) término da análise: perda menor que 1,0 mg em 120 (Ohaus MB 45) e 140 segundos (Mettler Toledo HB 43); e) intervalos entre as análises: 30 min, 2 min e sem intervalos.

#### **5.4.5 Validação da metodologia de determinação de água em analisador de umidade**

A validação foi realizada utilizando-se as drogas vegetais citadas anteriormente. Os ensaios foram realizados de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1998), com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bio-analíticos (BRASIL, 2003) e com Instituto Nacional de Metrologia Normatização e Qualidade Industrial (2003).

##### **5.4.5.1 Exatidão**

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003), e quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência). A exatidão pode ser expressa como recuperação analítica, através da relação valor observado / valor esperado (INMETRO, 2003).

No caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado, como uma metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado (ICH, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Para a validação da determinação de água em analisador de umidade, para as drogas vegetais em questão, a exatidão foi avaliada através da comparação entre os resultados obtidos em analisador de umidade com os obtidos através da metodologia farmacopéica “Determinação da perda por dessecação”, em percentagens (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos através da metodologia farmacopéica foram registrados e considerados como valores de referências para avaliar o grau de concordância com os resultados obtidos por intermédio da determinação de água em analisador de umidade. Para determinação de água em analisador de umidade, os resultados foram obtidos pela leitura direta no visor do aparelho, em percentagens.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

#### **5.4.5.2 Precisão**

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições definidas (ICH, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e considerada em 3 níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade trata do grau de concordância entre medições sucessivas de um mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo analista, mesma instrumentação.

A precisão intermediária refere-se a precisão avaliada sobre a mesma amostra utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas definindo exatamente

quais condições serão variadas, tais como: análises realizadas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou diferentes equipamentos.

A reprodutibilidade trata do grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mas realizadas em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Para a validação da metodologia proposta, a precisão foi avaliada através da análise da dispersão dos resultados entre os ensaios independentes, repetidos para a mesma amostra e expressos por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade foi avaliada através de medições sucessivas da mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições (mesmo procedimento de medição; mesmo analista; mesmo equipamento, usado sob as mesmas condições; mesmo laboratório) e com oito determinações ao dia. A precisão intermediária foi avaliada através dos resultados das oito determinações realizadas para uma mesma amostra, obtidas através de dois analistas, durante um período de sete dias. A reprodutibilidade foi avaliada através da concordância entre os resultados obtidos através das oito determinações realizadas no Laboratório de Farmacognosia de UFSC e no Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina, durante um período de sete dias.

A dispersão dos resultados foi avaliada através dos desvios padrões (DP) e do coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

#### **5.4.6 Análise estatística**

Os resultados obtidos na determinação de água, através das metodologias farmacopéicas, assim como, através do analisador de umidade foram analisados empregando-se o teste *t* de Student, com significância de  $p < 0,05$ .

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.5.1 Determinação de água segundo metodologias farmacopéicas

Os resultados obtidos através das metodologias farmacopéicas “Determinação da perda por dessecação”, “Determinação de água em drogas vegetais” e “Determinação de água por destilação azeotrópica” são apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Teores de água obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação de água por destilação azeotrópica” e “Determinação da perda por dessecação” (n = 8), nas drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

Droga vegetal	Determinação de água em drogas vegetais $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	Determinação de água por destilação azeotrópica $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	Determinação da perda por dessecação $\bar{X} \pm DP$ (CV%)
Calêndula	13,33 ± 0,44 <sup>a,c</sup> (3,31)	9,1 ± 0,4 <sup>a</sup> (4,9)	12,44 ± 0,50 <sup>c</sup> (4,03)
Espinheira-santa	7,19 ± 0,24 (3,31)	7,17 ± 0,26 (3,60)	7,29 ± 0,12 (1,70)
Funcho	10,41 ± 0,23 <sup>b</sup> (2,22)	8,2 ± 0,5 <sup>b</sup> (6,1)	10,54 ± 0,18 (1,77)
Maracujá	10,58 ± 0,26 (2,42)	10,50 ± 0,30 (3,0)	10,51 ± 0,21 (2,04)

Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa entre si (teste-*t* Student,  $p < 0,05$ )

Quanto aos resultados obtidos por meio da “Determinação de água em drogas vegetais” e da “Determinação de água por destilação azeotrópica”, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa para a espinheira-santa e para o maracujá. No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para calêndula e para o funcho, sendo essas duas espécies que contêm óleos voláteis (BISSET, 1996).

A Farmacopéia Brasileira preconiza um teor máximo de 12% para calêndula (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001a) e 10% para o funcho (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000a), e, portanto, as duas amostras estariam reprovadas, pois os resultados obtidos foram, respectivamente, 13,33% e 10,41%. No entanto, ambas seriam aprovadas, segundo os resultados obtidos através da destilação azeotrópica: 9,1% e 8,2%, respectivamente. É importante observar que apenas o funcho é considerado uma espécie rica em óleo volátil (BISSET, 1996), o que ressalta a importância de especificar nas respectivas monografias qual metodologia deve ser empregada para a determinação de água.

Na comparação dos resultados obtidos através da “Determinação da perda por dessecação” e da “Determinação de água em drogas vegetais”, foi observada uma diferença estatisticamente significativa apenas para calêndula, que poderia estar relacionada com a presença de óleo volátil e/ou de outros constituintes termossensíveis, dependentes do tempo de exposição ao calor.

Em relação ao tempo total de análise para a “Determinação da perda por dessecação” e da “Determinação de água em drogas vegetais”, observou-se que, apesar de existirem diferenças entre os dois procedimentos operacionais, ambos são demasiadamente longos, exigindo a dedicação dos operadores durante quase todo o procedimento. Quanto ao método azeotrópico, o tempo total de análise foi praticamente a metade do tempo necessário para a realização da “Determinação da perda por dessecação” (Tabela 5.2), sem considerar o tempo necessário à montagem dos aparelhos de destilação.

**Tabela 5.2:** Tempo total de análise necessário para a realização das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação de água por destilação azeotrópica” e “Determinação da Perda por dessecação” nas drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

Tempo total (h) Droga vegetal	Determinação de água drogas vegetais	Determinação de água por destilação azeotrópica*	Determinação da perda por dessecação
<b>Calêndula</b>	8:30	3:30	7:30
<b>Espinheira-santa</b>	7:30	3:30	5:30
<b>Funcho</b>	7:30	3:30	5:30
<b>Maracujá</b>	9:30	3:30	7:30

\* sem considerar o tempo médio necessário a montagem dos aparelhos de destilação

Na “Determinação de água em drogas vegetais”, constatou-se que é necessário um número menor de pesagens até obter a diferença de massa, entre duas pesagens sucessivas, menor que o preconizado na metodologia (5,0 mg). Na “Determinação da perda por dessecação”, a maior dificuldade encontrada foi a necessidade de chegar ao peso constante, pois observou-se que mesmo mantendo-as dentro de dessecador devidamente fechado, a partir de um determinado ponto, algumas amostras passavam a absorver umidade do ambiente e, conseqüentemente, aumentavam de peso, enquanto outras continuavam perdendo peso; no entanto, os valores dos teores de água não variavam mais. Observou-se também que, apesar de não se chegar ao peso constante, as diferenças obtidas entre as duas últimas pesagens consecutivas foram maiores que 0,5 mg, porém menores que 1,0 mg. Diante desta constatação, considerou-se a análise concluída quando não foram observadas variações entre as médias de duas pesagens sucessivas (Tabela 5.3).



**Tabela 5.3:** Teores de água (n = 8) obtidos através das metodologias “Determinação de água em drogas vegetais” e “Determinação da perda por dessecação”, para as drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá, após cada uma das pesagens realizadas.

	Pesagem	Calêndula $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	Espinheira-santa $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	Funcho $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	Maracujá $\bar{X} \pm DP$ (CV%)
Determinação de água em drogas vegetais (%)	1 <sup>a</sup>	9,81 ± 1,73 (17,68)	7,16 ± 0,23 (3,23)	9,84 ± 0,20 (2,01)	10,50 ± 0,22 (2,07)
	2 <sup>a</sup>	12,00 ± 0,51 (4,28)	7,19 ± 0,24 (3,31)	10,17 ± 0,21 (2,04)	10,48 ± 0,18 (1,76)
	3 <sup>a</sup>	12,44 ± 0,41 (3,26)	—	10,29 ± 0,22 (2,17)	10,41 ± 0,18 (1,77)
	4 <sup>a</sup>	12,44 ± 0,50 (4,03)	—	10,45 ± 0,23 (2,20)	—
	5 <sup>a</sup>	—	—	10,51 ± 0,21 (2,04)	—
Determinação da perda por dessecação (%)	1 <sup>a</sup>	12,61 ± 0,36 (2,38)	7,21 ± 0,15 (2,03)	10,09 ± 0,37 (3,69)	10,63 ± 0,42 (3,91)
	2 <sup>a</sup>	13,24 ± 0,40 (3,04)	7,27 ± 0,11 (1,49)	10,53 ± 0,27 (2,52)	10,46 ± 0,20 (1,87)
	3 <sup>a</sup>	13,33 ± 0,44 (3,27)	7,29 ± 0,12 (1,70)	10,54 ± 0,31 (2,95)	10,49 ± 0,24 (2,26)
	4 <sup>a</sup>	13,34 ± 0,45 (3,36)	—	10,57 ± 0,29 (2,78)	10,54 ± 0,23 (2,22)
	5 <sup>a</sup>	13,32 ± 0,42 (3,13)	—	10,57 ± 0,27 (2,59)	—
	6 <sup>a</sup>	13,33 ± 0,44 (3,31)	—	10,58 ± 0,26 (2,42)	—

Ainda em relação ao estabelecimento do término das análises, foi feita a comparação dos resultados da determinação de água, obtidos através da “Determinação da perda por dessecação”, quando a diferença entre duas pesagens consecutivas foi menor que 1,0 mg e 5,0 mg. Os resultados são apresentados na tabela 5.4, onde se pode verificar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos.

**Tabela 5.4:** Teores de água (n = 8) observadas através da metodologia “Determinação da perda por dessecação”, após duas pesagens consecutivas, nas drogas vegetais vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

	<b>Calêndula</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	<b>Espinheira-santa</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	<b>Funcho</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	<b>Maracujá</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)
<b>Diferença &lt; 1,0 mg</b>	<b>13,33 ± 0,44</b> (3,31)	<b>7,29 ± 0,12</b> (1,70)	<b>10,58 ± 0,26</b> (2,42)	<b>10,54 ± 0,23</b> (2,22)
<b>Diferença &lt; 5,0 mg</b>	<b>13,33 ± 0,44</b> (3,27)	<b>7,21 ± 0,15</b> (2,03)	<b>10,54 ± 0,31</b> (2,95)	<b>10,49 ± 0,24</b> (2,26)

Quanto à “Determinação de água em drogas vegetais”, constatou-se que os coeficientes de variação obtidos para as quatro plantas analisadas, ao final de cada análise, foram semelhantes aos obtidos na “Determinação da perda por dessecação” (Tabela 5.3). Cabe ressaltar que a quantidade de amostra utilizada na primeira técnica foi três vezes maior do que a utilizada na segunda; além disso, o tempo de secagem na estufa da primeira metodologia é mais que o dobro da segunda. No entanto, os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que representa um gasto maior em termos de energia, tempo e mão de obra, quando da execução da “Determinação de água em drogas vegetais”.

Diante da similaridade dos resultados apresentados e das vantagens acima expostas, propõe-se que o teor de água em drogas vegetais seja realizado de acordo com a metodologia “Determinação da perda por dessecação”, considerando-se a análise concluída quando a diferença entre duas pesagens consecutivas for menor do que 5,0 mg.

### 5.5.2 Determinação de água através de analisador de umidade

Nesta metodologia, os parâmetros de análise (massa da amostra e temperatura de análise) foram selecionados de acordo com os parâmetros preconizados na metodologia “Determinação da perda por dessecação”. Um ponto crítico para a determinação do teor de água através do analisador de umidade, e que não pôde ser estabelecido de acordo com as metodologias farmacopéicas, está relacionado com o término das análises. Nos dois aparelhos utilizados, após testes preliminares, selecionou-se, entre as opções de programação existentes, aquela que apresentou resultados mais próximos aos obtidos através da metodologia farmacopéica. No analisador de umidade Ohau, MB45, o critério selecionado para o término da análise foi: perda de massa menor do que 1,0 mg em 120 segundos; e no analisador de Umidade Mettler Toledo, MB43, foi a perda de massa menor do que 1,0 mg em 140 segundos.

Outro aspecto importante a ser observado é o intervalo entre as análises. Segundo Isengard e Färber (1999), os resultados da determinação de água em analisador de umidade dependem da temperatura em que o equipamento se encontra no início de cada análise. Por isso, com relação ao intervalo entre as análises, testou-se a utilização do aparelho quente e sem intervalos entre as medições; a utilização do aparelho frio, ou seja, com 30 minutos de intervalo entre as análises e a utilização com 2 min de intervalo entre o final de uma análise e o início da outra.

Para as análises realizadas com o aparelho quente e sem intervalos entre as análises observou-se que ocorre uma perda de massa substancial, antes mesmo do início da análise, o que leva a resultados errôneos. Para as análises realizadas com o aparelho frio, observou-se que os resultados obtidos são bastante precisos. No entanto, ao utilizar o aparelho frio o intervalo necessário para a realização das análises (30 min), caracteriza-se como uma desvantagem em relação ao tempo total da análise. Ao fixar o intervalo de tempo entre o final de uma análise e o início de outra em 2 min, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos ao fixar o intervalo entre as análises em 30 minutos. Além disso, os coeficientes de variação obtidos, embora um pouco maior, mostraram-se

pertinentes e, com isto, viabilizou-se um tempo total menor para a realização das análises (Tabela 5.5), corroborando com os resultados apresentados por Isengard e Färber (1999) e Isengard e colaboradores (2001).

**Tabela 5.5:** Determinação de água em analisador de umidade (n = 8), para as matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá, considerando-se diferentes tempos de intervalo entre as análises.

<b>Determinação de água em analisador de umidade</b>			
	Sem intervalo	30 min intervalo	2 min intervalo
	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)
<b>Calêndula</b>	<b>7,96 ± 0,14</b> <sup>a,b</sup> (1,76)	<b>8,16 ± 0,08</b> <sup>a</sup> (0,93)	<b>8,20 ± 0,10</b> <sup>b</sup> (1,19)
<b>Espinheira-santa</b>	<b>6,14 ± 0,08</b> <sup>c,d</sup> 1,36	<b>6,27 ± 0,05</b> <sup>c</sup> (0,82)	<b>6,25 ± 0,06</b> <sup>d</sup> (1,02)
<b>Funcho</b>	<b>8,22 ± 0,10</b> <sup>e,f</sup> (1,24)	<b>8,36 ± 0,08</b> <sup>e</sup> (0,93)	<b>8,33 ± 0,07</b> <sup>f</sup> (0,81)
<b>Maracujá</b>	<b>8,07 ± 0,10</b> <sup>g,h</sup> (1,24)	<b>8,40 ± 0,08</b> <sup>g</sup> (0,91)	<b>8,39 ± 0,09</b> <sup>h</sup> (1,06)

Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativa entre si (Teste-t Student, p <0,05)

### 5.5.3 Validação da metodologia de determinação de água em analisador de umidade

Após o estabelecimento dos parâmetros de análise, realizou-se a validação da metodologia proposta para as quatro drogas vegetais em estudo. Tendo em vista os resultados obtidos anteriormente, através da comparação das metodologias farmacopéicas, a exatidão da metodologia proposta em analisador de umidade foi avaliada através do quociente entre os resultados obtidos com o analisador de umidade da marca Ohaus, com aqueles obtidos através da “Determinação da perda por dessecação”, considerando-se como critério para o término da análise a diferença menor que 5,0 mg entre duas pesagens sucessivas. A análise estatística

dos resultados mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados obtidos através do uso do analisador de umidade, levando-se em conta os parâmetros de análise fixados, e os resultados da “Determinação da perda por dessecação” (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6:** Comparação entre os teores de água ( $n = 8$ ) obtidos através da “Determinação da perda por dessecação”, e da “Determinação de água em analisador de umidade”, para as drogas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e maracujá.

<b>Droga vegetal</b>	<b>Determinação da perda por dessecação</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	<b>Determinação de água em analisador de umidade</b> $\bar{X} \pm DP$ (CV%)	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Calendula</b>	<b>8,27 ± 0,16</b> (1,96)	<b>8,27 ± 0,11</b> (1,96)	<b>100,00</b>
<b>Espinheira-santa</b>	<b>6,23 ± 0,12</b> (1,97)	<b>6,37 ± 0,13</b> (1,97)	<b>102,25</b>
<b>Funcho</b>	<b>8,60 ± 0,17</b> (2,03)	<b>8,44 ± 0,12</b> (1,36)	<b>98,14</b>
<b>Maracujá</b>	<b>8,51 ± 0,17</b> (1,95)	<b>8,46 ± 0,13</b> (1,49)	<b>99,41</b>

Quanto à precisão, os coeficientes de variação (CV%) obtidos em analisador de umidade, relativos a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, não foram maiores do que 2%. Além disso, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados obtidos para as mesmas, confirmando, assim, a precisão da metodologia proposta (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7:** Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (n = 8), para as matéria-prima vegetal calêndula.

<b>Calêndula</b>			
	<b>Condição 1</b>	<b>Condição 2</b>	<b>Condição 3</b>
<b>Dia</b>	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)
<b>1</b>	<b>8,38 ± 0,18</b> (2,10)	<b>8,32 ± 0,24</b> (2,85)	<b>8,50 ± 0,15</b> (1,76)
<b>2</b>	<b>8,21 ± 0,17</b> (2,03)	<b>8,30 ± 0,11</b> (1,37)	<b>8,21 ± 0,14</b> (1,67)
<b>3</b>	<b>8,31 ± 0,13</b> (1,55)	<b>8,55 ± 0,16</b> (1,84)	<b>8,47 ± 0,21</b> (2,43)
<b>4</b>	<b>8,22 ± 0,16</b> (1,96)	<b>8,26 ± 0,11</b> (1,34)	<b>8,49 ± 0,13</b> (1,52)
<b>5</b>	<b>8,27 ± 0,11</b> (1,28)	<b>8,34 ± 0,14</b> (1,72)	<b>8,35 ± 0,19</b> (2,27)
<b>6</b>	<b>8,13 ± 0,22</b> (2,70)	<b>8,41 ± 0,15</b> (1,74)	<b>8,26 ± 0,16</b> (1,88)
<b>7</b>	<b>8,49 ± 0,18</b> (2,11)	<b>8,51 ± 0,11</b> (1,31)	<b>8,33 ± 0,17</b> (2,09)
<b>X</b>	<b>8,29</b>	<b>8,38</b>	<b>8,37</b>
<b>DP</b>	<b>0,11</b>	<b>0,10</b>	<b>0,11</b>
<b>(CV%)</b>	<b>1,35</b>	<b>1,22</b>	<b>1,29</b>

**Condição 1:** Analista 1, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 2:** Analista 2, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 3:** Analista 1; Aparelho 2; Laboratório 2. Aparelho 1: Ohaus, MB45; Aparelho 2: Mettlet Toledo, HB43; Analista 1: autora; Analista 2: colaboradora; Laboratório 1: Laboratório de Farmacognosia da UFSC; Laboratório 2: Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina – LAFESC.

**Tabela 5.8:** Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (n = 8), para as matéria-prima vegetal espinheira-santa.

<b>Espinheira-santa</b>			
<b>Dia</b>	<b>Condição 1</b>	<b>Condição 2</b>	<b>Condição 3</b>
	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)
1	6,25 ± 0,14 (2,18)	6,35 ± 0,18 (2,88)	6,30 ± 0,18 (2,82)
2	6,23 ± 0,16 2,64	6,31 ± 0,10 (1,62)	6,27 ± 0,16 (2,50)
3	6,30 ± 0,09 (1,35)	6,44 ± 0,07 (1,09)	6,40 ± 0,18 (2,84)
4	6,37 ± 0,13 (1,97)	6,28 ± 0,14 (2,30)	6,34 ± 0,17 (2,65)
5	6,26 ± 0,19 (2,99)	6,49 ± 0,07 (1,06)	6,23 ± 0,11 (1,71)
6	6,34 ± 0,07 1,16	6,22 ± 0,17 (2,71)	6,41 ± 0,17 (2,60)
7	6,47 ± 0,12 (1,82)	6,45 ± 0,17 (2,58)	6,22 ± 0,13 (2,15)
<b>X</b>	<b>6,31</b>	<b>6,36</b>	<b>6,31</b>
<b>DP</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,07</b>
<b>(CV%)</b>	<b>1,21</b>	<b>1,44</b>	<b>1,14</b>

**Condição 1:** Analista 1, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 2:** Analista 2, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 3:** Analista 1; Aparelho 2; Laboratório 2. Aparelho 1: Ohaus, MB45; Aparelho 2: Mettler Toledo, HB43; Analista 1: autora; Analista 2: colaboradora; Laboratório 1: Laboratório de Farmacognosia da UFSC; Laboratório 2: Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina – LAFESC.

**Tabela 5.9:** Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (n = 8), para as matéria-prima vegetal funcho.

<b>Funcho</b>			
<b>Dia</b>	<b>Condição 1</b>	<b>Condição 2</b>	<b>Condição 3</b>
	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)
<b>1</b>	<b>8,38 ± 0,26</b> (3,16)	<b>8,51 ± 0,13</b> (1,53)	<b>8,62 ± 0,23</b> (2,64)
<b>2</b>	<b>8,55 ± 0,14</b> (1,63)	<b>8,39 ± 0,15</b> (1,80)	<b>8,42 ± 0,18</b> (2,13)
<b>3</b>	<b>8,30 ± 0,24</b> (2,93)	<b>8,63 ± 0,18</b> (2,11)	<b>8,38 ± 0,19</b> (2,26)
<b>4</b>	<b>8,58 ± 0,16</b> (1,83)	<b>8,50 ± 0,18</b> (2,11)	<b>8,35 ± 0,12</b> (1,44)
<b>5</b>	<b>8,44 ± 0,12</b> (1,36)	<b>8,41 ± 0,20</b> (2,40)	<b>8,34 ± 0,15</b> (1,82)
<b>6</b>	<b>8,36 ± 0,20</b> (2,41)	<b>8,33 ± 0,21</b> (2,51)	<b>8,43 ± 0,13</b> (1,54)
<b>7</b>	<b>8,30 ± 0,14</b> (1,74)	<b>8,32 ± 0,17</b> (2,10)	<b>8,32 ± 0,15</b> (1,84)
<b>X</b>	<b>8,41</b>	<b>8,44</b>	<b>8,41</b>
<b>DP</b>	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>
<b>(CV%)</b>	<b>1,24</b>	<b>1,21</b>	<b>1,24</b>

**Condição 1:** Analista 1, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 2:** Analista 2, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 3:** Analista 1; Aparelho 2; Laboratório 2. Aparelho 1: Ohaus, MB45; Aparelho 2: Mettlet Toledo, HB43; Analista 1: autora; Analista 2: colaboradora; Laboratório 1: Laboratório de Farmacognosia da UFSC; Laboratório 2: Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina – LAFESC.



**Tabela 5.10:** Resultados da determinação de água em analisador de umidade visando a avaliação das análises relativas à repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (n = 8), para as matéria-prima vegetal maracujá.

<b>Maracujá</b>			
<b>Dia</b>	<b>Condição 1</b>	<b>Condição 2</b>	<b>Condição 3</b>
	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)	$\bar{X} \pm DP$ (CV%)
<b>1</b>	<b>8,52 ± 0,23</b> (2,66)	<b>8,61 ± 0,24</b> (2,76)	<b>8,58 ± 0,21</b> (2,45)
<b>2</b>	<b>8,71 ± 0,16</b> (1,78)	<b>8,59 ± 0,18</b> 2,11	<b>8,59 ± 0,22</b> (2,58)
<b>3</b>	<b>8,42 ± 0,22</b> (2,58)	<b>8,74 ± 0,17</b> (1,98)	<b>8,70 ± 0,20</b> (2,27)
<b>4</b>	<b>8,46 ± 0,13</b> (1,49)	<b>8,58 ± 0,18</b> (2,15)	<b>8,60 ± 0,18</b> (2,11)
<b>5</b>	<b>8,79 ± 0,11</b> (1,24)	<b>8,62 ± 0,18</b> (2,07)	<b>8,51 ± 0,15</b> (1,77)
<b>6</b>	<b>8,69 ± 0,13</b> (1,48)	<b>8,87 ± 0,15</b> (1,71)	<b>8,59 ± 0,17</b> (2,01)
<b>7</b>	<b>8,73 ± 0,12</b> (1,41)	<b>8,63 ± 0,14</b> (1,61)	<b>8,66 ± 0,16</b> (1,83)
<b>X</b>	<b>8,62</b>	<b>8,66</b>	<b>8,60</b>
<b>DP</b>	<b>0,14</b>	<b>0,10</b>	<b>0,06</b>
<b>(CV%)</b>	<b>1,58</b>	<b>1,11</b>	<b>0,65</b>

**Condição 1:** Analista 1, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 2:** Analista 2, Aparelho 1, Laboratório 1; **Condição 3:** Analista 1, Aparelho 2, Laboratório 2. Aparelho 1: Ohaus, MB45; Aparelho 2: Mettler Toledo, HB43; Analista 1: autora; Analista 2: colaboradora; Laboratório 1: Laboratório de Farmacognosia da UFSC; Laboratório 2: Laboratório Farmacêutico do Estado de Santa Catarina – LAFESC.

## 6 DETERMINAÇÃO DE CINZAS

### 6.1 INTRODUÇÃO

A determinação de cinzas, também chamada resíduo de incineração, é uma das metodologias preconizadas em praticamente todas as farmacopéias para fármacos de estrutura definida e é também um dos ensaios de pureza preconizados para avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais.

Esta metodologia permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes (WHO, 1998), através da pesagem direta das substâncias inorgânicas residuais, obtidas após a incineração da amostra sob condições especificadas (KITAGAWA et al, 2002). A determinação de cinzas pode ser realizada através de três métodos diferentes: cinzas totais, cinzas sulfatadas e cinzas insolúveis em ácido. No entanto, normalmente, apenas as determinações de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido são preconizadas para drogas vegetais.

As cinzas totais referem-se à quantidade total de material inorgânico residual após a incineração. Isto inclui as “cinzas fisiológicas”, derivadas do próprio tecido vegetal da planta, e as “cinzas não fisiológicas”, resíduo de materiais estranhos, como, por exemplo, areia e terra aderidos à superfície da planta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b). As cinzas totais são constituídas principalmente por carbonatos, fosfatos, silicatos e sílica (EVANS, 1996).

Segundo Evans (1996), a determinação de cinzas totais deve ser realizada em temperatura inferior a 450 °C, por causa dos cloretos de alcális que podem ser volatilizados a temperaturas superiores. No entanto, todo o material deve ser incinerado até que o resíduo de cinzas obtido torne-se branco e, se ainda houver partículas negras após a incineração a temperatura moderada, as cinzas devem ser umedecidas com água, secas e o resíduo deve ser incinerado novamente, até peso

constante (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b; WHO, 1998; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002).

Na determinação de cinzas sulfatadas a droga vegetal é tratada com ácido sulfúrico diluído antes da incineração. Neste processo, todos os óxidos, cloretos e carbonatos são convertidos em sulfatos, e assim, a incineração pode ser realizada a temperaturas superiores (600°C) (EVANS, 1996). Segundo Hartke e Mutschler (1986) a composição do resíduo de incineração sofre variações, de acordo com o tempo e com a temperatura empregada. Mesmo com a utilização de uma temperatura de incineração média, os cloretos de álcalis podem ser volatilizados, os carbonatos de metais alcalino-terrosos decompostos e pode ocorrer ainda a formação de pirossulfatos. No entanto, a determinação de cinzas sulfatadas é preferida para substâncias puras enquanto que para drogas vegetais e produtos naturais, como a glicerina, é preconizada a determinação de cinzas totais.

Se o resíduo obtido após a determinação de cinzas totais ou sulfatadas for tratado com ácido clorídrico diluído, a percentagem de cinzas insolúveis em ácido pode ser determinada. Esta metodologia foi desenvolvida para medir a quantidade de sílica presente na amostra, proveniente de impurezas como areias e silicatos de terra. Para matérias-primas vegetais utilizadas diretamente como droga pulverizada, como o sene, por exemplo, é requerido baixo teor de cinzas insolúveis em ácido (< 2,5%). Se o teor de cinzas insolúveis em ácido obtido for elevado, há indicativos de contaminação com areia (EVANS, 1996). No entanto, para algumas matérias-primas vegetais é permitido um teor mais elevado de cinzas insolúveis em ácido, como as folhas de meimendo negro (*Hyoscyamus niger* L.), por exemplo, cuja especificação é de no máximo 12,0 % (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002), ou ainda para as folhas da dedeieira (*Digitalis purpurea* L.), cuja especificação é de no máximo 5,0% (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002).

Ao comparar as metodologias de determinação de cinzas em diferentes farmacopéias, verificou-se que diferentes temperaturas de incineração são preconizadas. Na Farmacopéia Brasileira (1988a), Européia (2002), Americana (2003) as temperaturas preconizadas para a determinação de cinzas totais são respectivamente 450°C, 600°C, 675°C. A farmacopéia Japonesa (2001) preconiza o emprego de temperatura inferior a 550°C, além disso, é a única farmacopéia, entre

as demais consultadas, que preconiza o tempo inicial de incineração a ser empregado, no caso 3 h. Isto é particularmente importante para a determinação de cinzas totais, pois as metodologias recomendam verificar se ainda há partículas negras, após a incineração inicial, e neste caso, o resíduo deve ser umedecido com água e incinerado até peso constante. Quanto a determinação de cinzas sulfatadas a Farmacopéia Brasileira (1988a) preconiza 800°C, a Farmacopéia Européia (2002) mantém os 600°C, a Americana (2003) também preconiza 600°C e na Japonesa (2001) não consta a metodologia de determinação de cinzas sulfatadas.

Além da determinação de cinzas, outro ensaio muito importante para a avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais está relacionado com determinação de metais pesados (WHO, 1998; FARIAS, 2004). Estes podem ser provenientes do solo, da água de irrigação, da própria atmosfera e aumentam com a poluição ambiental. As fontes de poluição ambiental são bastante variadas, desde a poluição proveniente das indústrias e dos automóveis, até aquelas oriundas de excipientes agropecuários, tais como adubos contendo cádmio, fungicidas e inseticidas contendo organofosforados (SCHILCHER; PETERS; WANK, 1987 apud ABOU-ARAB et al, 1999).

Atualmente, mediante à preocupação com os elevados níveis de poluição alcançados, várias medidas têm sido tomadas na tentativa de minimizar a liberação dos mesmos no meio-ambiente. No entanto, os valores encontrados ainda são bastante elevados e vários pesquisadores têm estudado os níveis residuais de metais tóxicos em drogas vegetais, principalmente devido ao valor econômico das exportações de matérias-primas vegetais, bem como ao uso freqüente de preparações contendo drogas vegetais por crianças, adultos e idosos (ABOU-ARAB et al, 1999). Os metais pesados podem contaminar diferentes plantas causando sérios problemas à saúde, tais como sintomas de toxicidade crônica e problemas renais e hepáticos (GRAVEL et al, 1994 apud ABOU-ARAB et al, 1999; TONG; CHIRNDING; PRAPAMONTOL, 2000; WHO, 2003). Outro detalhe importante refere-se à falta de especificação quanto aos níveis de metais pesados aceitáveis em matérias-primas vegetais e em medicamentos fitoterápicos, sendo considerado os mesmos níveis estabelecido para os alimentos (FARIAS, 2004).

Segundo Schilcher e colaboradores (1987), os métodos de análises farmacopéicas tradicionais são baseados nos ensaios-limites, considerados não seletivos e de baixa precisão. Diante deste quadro, vários pesquisadores vêm investigando a determinação de metais pesados através da espectrofotometria de absorção atômica, espectroscopia de emissão atômica ou voltometria inversa (FARIAS, 2004).

## 6.2 OBJETIVOS

- Comparar os resultados obtidos para a determinação de cinzas totais e cinzas sulfatadas nas seguintes drogas vegetais: calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela, ao empregar diferentes temperaturas (450°, 600° e 800°C) e diferentes tempos de incineração (2 h e 4 h).
- Avaliar a aplicabilidade da determinação de cinzas sulfatadas em relação às cinzas totais no controle de qualidade de matérias-primas vegetais.
- Determinar a melhor temperatura e o tempo de incineração a serem empregados para a determinação de cinzas totais e cinzas sulfatadas.

## **6.3 MATERIAS**

### **6.3.1 Material vegetal**

Para a determinação de cinzas foram utilizadas as seguintes matérias-primas vegetais: calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela. Conforme está descrito no item 3.3.1 do capítulo 3 – Caracterização por cromatografia em camada delgada. No entanto

### **6.3.2 Aparelhos e Equipamentos**

Mufla (Elektro Thrm GMBH); Balança analítica (Gibertin – E42-S-B); Perkin Elmer Analyst A300; Forno de grafite HGA800; Amostrador automático AS72.

### **6.3.3 Reagentes, soluções e substâncias reagentes**

Ácido sulfúrico 10% (Nuclear); ácido clorídrico 7% (Nuclear).

## 6.4 MÉTODOS

### 6.4.1 Determinação de Cinzas totais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000b)

Em cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados, pesaram-se exatamente cerca de 3,0 g de cada uma das amostras pulverizadas. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadinho e calcinadas previamente em manta aquecedora até que não se observasse mais o desprendimento de fumaça branca. Após a calcinação, os cadinhos foram incinerados em mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente, a uma temperatura de 450°C, até que todas as partículas negras fossem eliminadas. Nos casos em que isso não se verificava, após o resfriamento, foram adicionados cerca de 2 mL de água, a mesma foi evaporada até a secura e procedeu-se a incineração até peso constante.

Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (DP) de oito determinações, em percentagens sobre a quantidade de droga pesada.

### 6.4.2 Determinação de Cinzas sulfatadas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988a)

Em cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados, pesou-se exatamente cerca de 1,0 g de cada uma das amostras pulverizadas. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadinho, onde foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico SR. As amostras foram previamente calcinadas em manta aquecedora até que não se observasse mais o desprendimento de fumaça branca. Após a calcinação, os cadinhos foram incinerados em mufla, aumentando-se a temperatura gradativamente até a temperatura de 800°C, até que não fosse detectada a presença de partículas negras. Após a primeira incineração, adicionou-



se cerca de 1 mL de ácido sulfúrico SR ao resíduo. Os resíduos foram secos em mantas aquecedoras e incinerados até peso constante.

Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (DP) de oito determinações, em percentagens sobre a quantidade de droga pesada.

#### 6.4.2.1 Parâmetros analisados

Durante a realização das análises os parâmetros analisados foram: temperatura de incineração, tempo inicial de incineração, teor de cinzas totais *versus* teor de cinzas sulfatadas, conforme a tabela 6.1.

**Tabela 6.1:** Parâmetros de análise empregados para a determinações de cinzas nas matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela.

Procedimento	Método	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Teor de cinzas $\bar{X} \pm DP$ (CV%)
1	Totais	450	2	
	Sulfatadas	450	2	
2	Totais	450	4	
	Sulfatadas	450	4	
3	Totais	600	2	
	Sulfatadas	600	2	
4	Totais	600	4	
	Sulfatadas	600	4	
5	Totais	800	2	
	Sulfatadas	800	2	
6	Totais	800	4	
	Sulfatadas	800	4	

### 6.4.3 Determinação de metais pesados

A determinação da composição química dos resíduos de cinzas obtidos através da determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas nas matérias-primas vegetais analisadas foi realizada pelo professor Dr. Pedro Eduardo Fröhlich, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para a preparação das soluções amostras foram pesados, separadamente, 100 mg de cada uma dos resíduos diretamente em tubos eppendorf de 2 mL e adicionou-se 2 mL de ácido nítrico concentrado. O material foi deixado por 30 minutos em ultra-som e 1 h em estufa a 50°C. As amostras foram preparadas diretamente em frasco descontaminados e com reagentes de elevada pureza para evitar a ocorrência de contaminações.

Os metais analisados foram chumbo (Pb), cádmio (Cd), níquel (Ni), manganês (Mn) e cobalto (Co).

As análises foram realizadas em aparelho Perkin Elmer Analyst A300, com forno de grafite HGA800 e amostrador automático AS72.

### 6.4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos na determinação de cinzas totais e sulfatadas, através das diferentes temperaturas e tempos de incineração foram analisados empregando-se o teste *t* de Student, com significância de  $p < 0,05$ .

## 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.5.1 Determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas

Os resultados obtidos através da “Determinação de cinzas totais” e da “Determinação de cinzas sulfatadas”, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração, para calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela estão apresentados nas Tabelas 6.2, 6.3, 6.4 e 6.5. Através da análise estatística foram constatadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de cinzas totais e de cinzas sulfatadas para todas as drogas vegetais analisadas. Verificou-se, ainda, que o teor de cinzas sulfatadas foi, em média, 50,0% superior ao teor de cinzas totais.

Para a calêndula, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de cinzas totais obtidos, ao empregar 2 h e 4 h como tempo inicial de incineração em nenhuma das três temperaturas utilizadas. Da mesma forma, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de cinzas sulfatadas obtidos. Quanto à temperatura de incineração foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os resultados obtidos, em todas as temperaturas testadas, tanto para cinzas totais quanto para cinzas sulfatadas (Tabela 6.2).

**Tabela 6.2:** Teores de cinzas (n = 8), para a droga vegetal calêndula, obtidos através da determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas sulfatadas (CS), empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração.

<b>Calêndula</b>				
<b>Procedimento</b>	<b>Variáveis</b>	<b>CT<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b>CS<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b><math>\Delta CS - CT</math></b> (%)
<b>1</b>	<b>450°C/2 h</b>	7,60 ± 0,16 <sup>b,c</sup> 2,13	11,52 ± 0,72 <sup>e,f</sup> 6,23	3,92 (51,58)
<b>2</b>	<b>450°C/4 h</b>	7,57 ± 0,16 2,13	12,14 ± 0,57 4,73	4,57 (60,37)
<b>3</b>	<b>600°C/2 h</b>	7,38 ± 0,14 <sup>b,d</sup> 1,91	9,34 ± 0,21 <sup>e,g</sup> 2,25	1,96 (26,56)
<b>4</b>	<b>600°C/4 h</b>	7,44 ± 0,13 1,73	9,27 ± 0,15 1,57	1,83 (24,60)
<b>5</b>	<b>800°C/2 h</b>	6,28 ± 0,11 <sup>c,d</sup> 1,68	9,10 ± 0,17 <sup>f,g</sup> 1,88	2,82 (44,90)
<b>6</b>	<b>800°C/4 h</b>	6,31 ± 0,10 1,64	9,13 ± 0,09 1,00	2,82 (44,69)

Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si (teste-t Student, p<0,05)

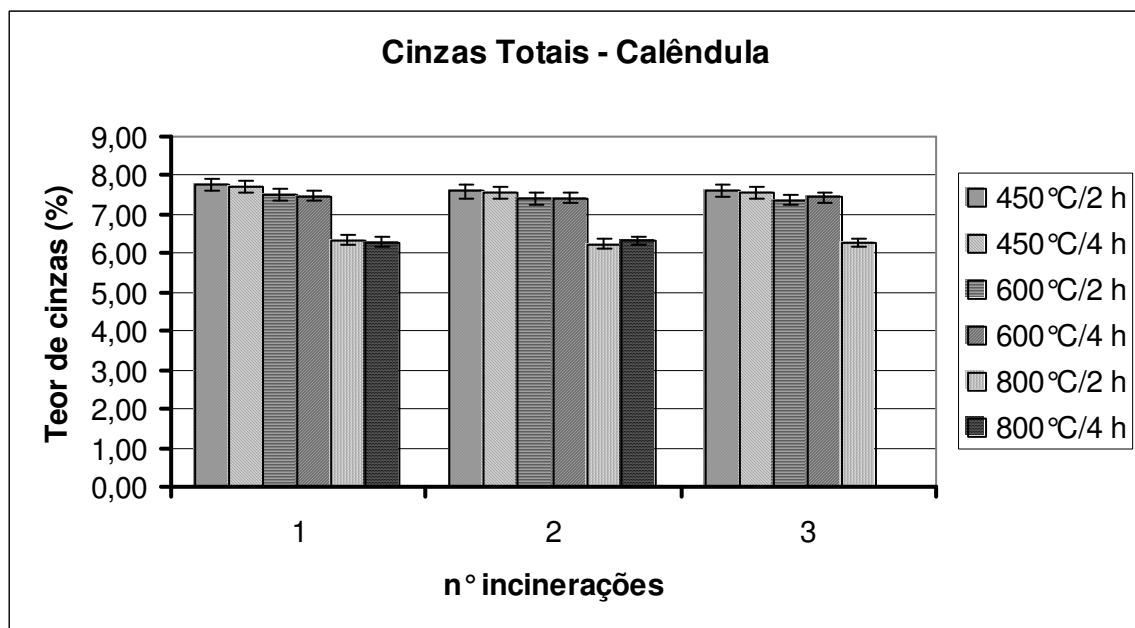
Em relação às duas metodologias testadas, determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, verificou-se que a diferença entre os teores de cinzas obtidos foi menor a 600°C, o qual foi cerca de 25%. Nas demais temperaturas a diferença observada foi superior a 40%.

Ao analisar os resultados da determinação de cinzas totais nas três temperaturas empregadas, considerando apenas duas horas como tempo inicial de incineração (Tabela 6.2), verificou-se que os teores de cinzas obtidos a 600°C e a 450°C mostraram uma diferença de três pontos percentuais. A 800°C o teor de cinzas totais foi cerca de 17 pontos percentuais inferior ao obtido a 450°C, e aproximadamente 15 pontos percentuais inferior ao obtido a 600°C.

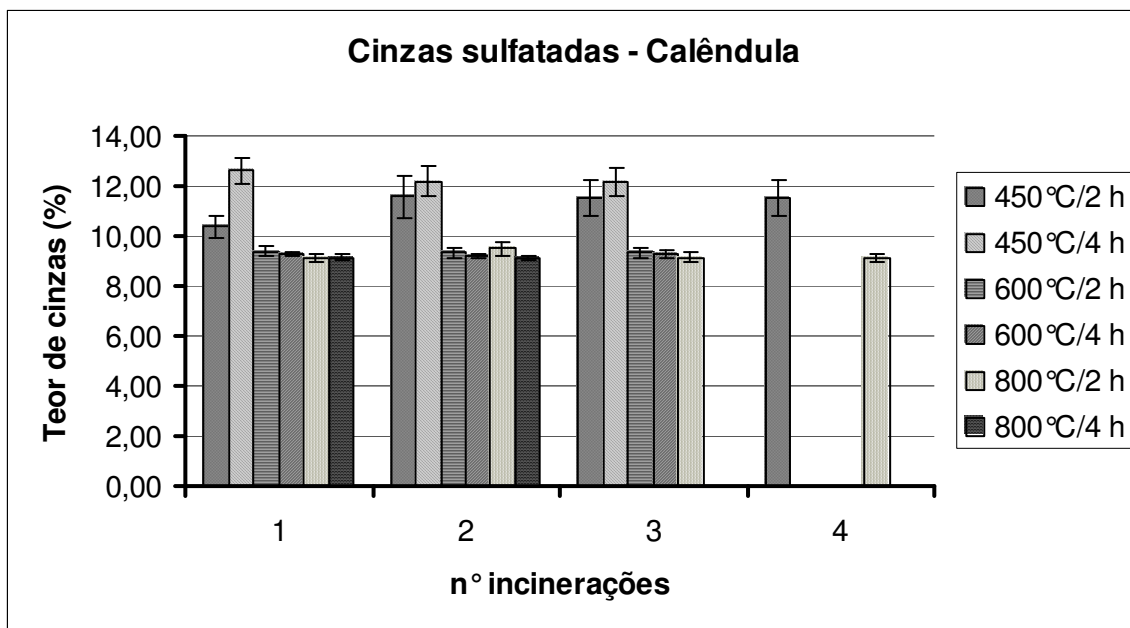
Em relação à comparação dos teores de cinzas sulfatadas a 450°C e a 600°C constatou-se uma diferença bem maior. No entanto, a 600°C e a 800°C essa diferença foi consideravelmente menor. A saber, a 800°C os resultados da determinação de cinzas sulfatadas foram em média 21 pontos percentuais inferiores aos obtidos a 450°C e apenas 3 pontos percentuais inferiores aos obtidos a 600°C.

Já os resultados da determinação de cinzas sulfatadas a 600 °C foram cerca de 19 pontos percentuais inferiores aos obtidos a 450 °C.

Os resultados obtidos através da determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, nos diferentes tempos e temperaturas de incineração, estão representados nas figuras 6.1 e 6.2. Os aspectos considerados foram o teor de cinzas, o número de incinerações realizadas até que a análise pudesse ser considerada concluída e o desvio padrão.



**Figura 6.1:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais para a droga vegetal calêndula, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração (n = 8).



**Figura 6.2:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal calêndula, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração (n = 8).

Para espinheira-santa, assim como para calêndula, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de cinzas obtidos ao empregar 2 h e 4 h como tempo inicial de incineração, nas três temperaturas utilizadas, tanto na determinação de cinzas totais quanto na determinação de cinzas sulfatadas. Em relação à temperatura de incineração foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os resultados obtidos, em todas as temperaturas testadas, nas duas metodologias empregadas (Tabela 6.3).

**Tabela 6.3:** Teores de cinzas (n = 8), para a droga vegetal espinheira-santa, obtidos através da determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas sulfatadas (CS), empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração.

<b>Espinheira-santa</b>				
<b>Procedimento</b>	<b>Variáveis</b>	<b>CT<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b>CS<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b><math>\Delta CS - CT</math></b> (%)
<b>1</b>	<b>450°C/2 h</b>	5,76 ± 0,16 <sup>b,c</sup> 2,72	8,08 ± 0,58 <sup>e,f</sup> 7,19	2,32 (40,28)
<b>2</b>	<b>450°C/4 h</b>	5,63 ± 0,10 1,77	8,36 ± 0,42 5,04	2,73 (48,49)
<b>3</b>	<b>600°C/2 h</b>	3,99 ± 0,11 <sup>b,d</sup> 2,64	7,13 ± 0,12 <sup>e,g</sup> 1,70	3,14 (78,70)
<b>4</b>	<b>600°C/4 h</b>	4,09 ± 0,16 4,03	7,11 ± 0,23 3,30	3,02 (73,84)
<b>5</b>	<b>800°C/2 h</b>	3,44 ± 0,11 <sup>c,d</sup> 3,22	6,79 ± 0,32 <sup>f,g</sup> 4,68	3,35 (97,38)
<b>6</b>	<b>800°C/4 h</b>	3,39 ± 0,08 2,35	6,87 ± 0,13 1,86	3,48 (102,65)

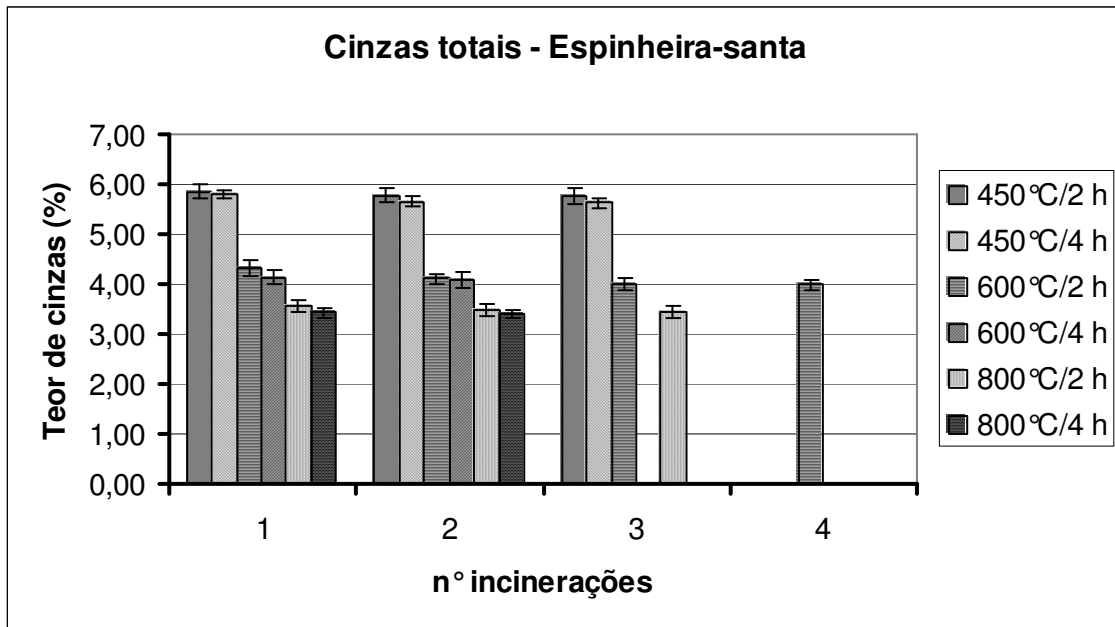
Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si (teste-t Student, p<0,05)

Em relação às duas metodologias empregadas para a determinação de cinzas, verificou-se que a diferença entre os teores obtidos, nas três temperaturas empregadas, foi superior a 40% , sendo que a 800°C essa diferença chegou a 100%.

Os resultados da determinação de cinzas totais, considerando-se apenas duas horas com tempo de incineração, mostraram-se bastante diferentes dos observados para calêndula. A diferença entre os teores de cinzas totais a 450°C e a 600°C ficou em torno dos trinta e um pontos percentuais, entre 450°C e 800°C a diferença foi cerca de quarenta pontos percentuais. Já entre os teores de cinzas a 600°C e 800°C a diferença média foi de quatorze pontos percentuais.

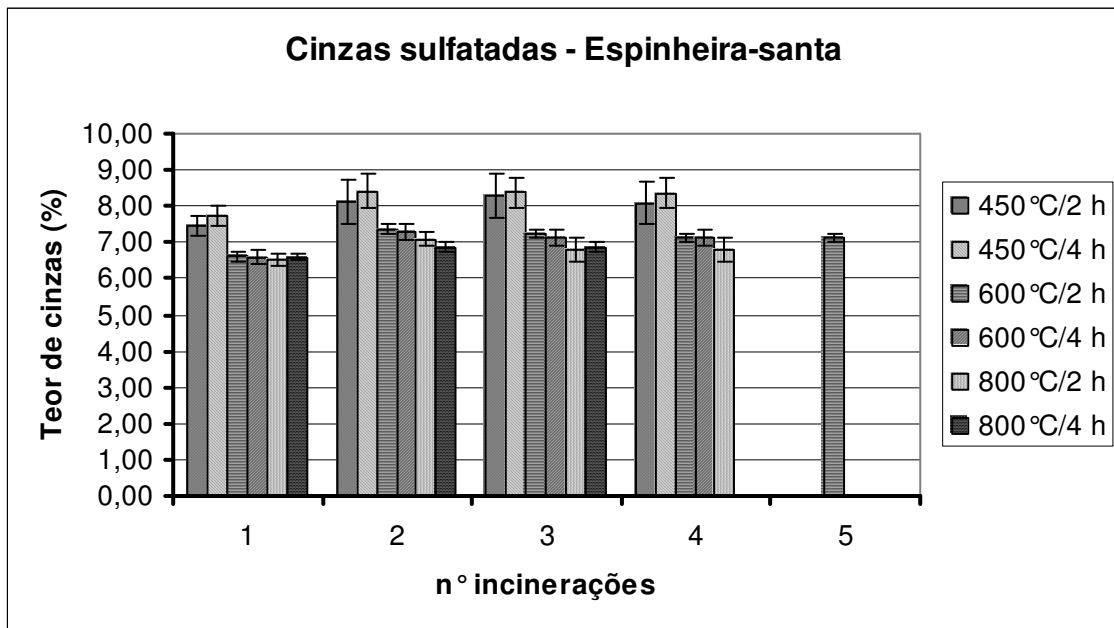
Em relação ao teor de cinzas sulfatadas, as diferenças observadas, embora de forma um pouco menos acentuada, foram similares às diferenças verificadas para a calêndula. O teor de cinzas sulfatadas a 450°C foi cerca de onze pontos percentuais superior ao obtido a 600°C e dezesseis pontos percentuais superior ao obtido a 800°C. A 600°C o teor de cinzas sulfatadas foi em média cinco pontos percentuais superior ao obtido a 800°C.

Os resultados obtidos através da determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, para a espinheira-santa, nas diferentes temperaturas e nos diferentes tempos de incineração, estão representados nas figuras 6.3 e 6.4.



**Figura 6.3:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal espinheira-santa, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração (n = 8).





**Figura 6.4:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal espinheira-santa, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração (n = 8)

Os resultados obtidos na determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas para o funcho foram semelhantes aos obtidos para calêndula e para a espinheira-santa. Tanto na determinação de cinzas totais quanto na determinação de cinzas sulfatadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de cinzas obtidos ao empregar 2 h ou 4 h como tempo inicial de incineração, nas três temperaturas utilizadas. Quanto à temperatura de incineração, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os resultados obtidos, em todas as temperaturas testadas (Tabela 6.4).

**Tabela 6.4:** Teores de cinzas ( $n = 8$ ), para a droga vegetal funcho, obtidos através da determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas sulfatadas (CS), empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração.

<b>Funcho</b>				
<b>Procedimento</b>	<b>Variáveis</b>	<b>CT<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b>CS<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b><math>\Delta CS - CT</math></b> (%)
<b>1</b>	<b>450°C/2h</b>	8,74 ± 0,10 <sup>b,c</sup> 1,12	13,03 ± 0,56 <sup>d,f</sup> 4,27	4,29 (49,08)
<b>2</b>	<b>450°C/4h</b>	8,61 ± 0,17 1,94	13,13 ± 0,28 2,10	4,52 (52,50)
<b>3</b>	<b>600°C/2h</b>	8,09 ± 0,29 <sup>b,d</sup> 3,53	12,10 ± 0,16 <sup>d,g</sup> 1,35	4,01 (49,57)
<b>4</b>	<b>600°C/4h</b>	8,04 ± 0,18 2,24	12,15 ± 0,25 2,06	4,11 (51,12)
<b>5</b>	<b>800°C/2h</b>	7,46 ± 0,08 <sup>c,d</sup> 1,11	11,33 ± 0,48 <sup>f,g</sup> 4,28	3,87 (51,88)
<b>6</b>	<b>800°C/4h</b>	7,33 ± 0,18 2,45	11,14 ± 0,14 1,21	3,81 (51,98)

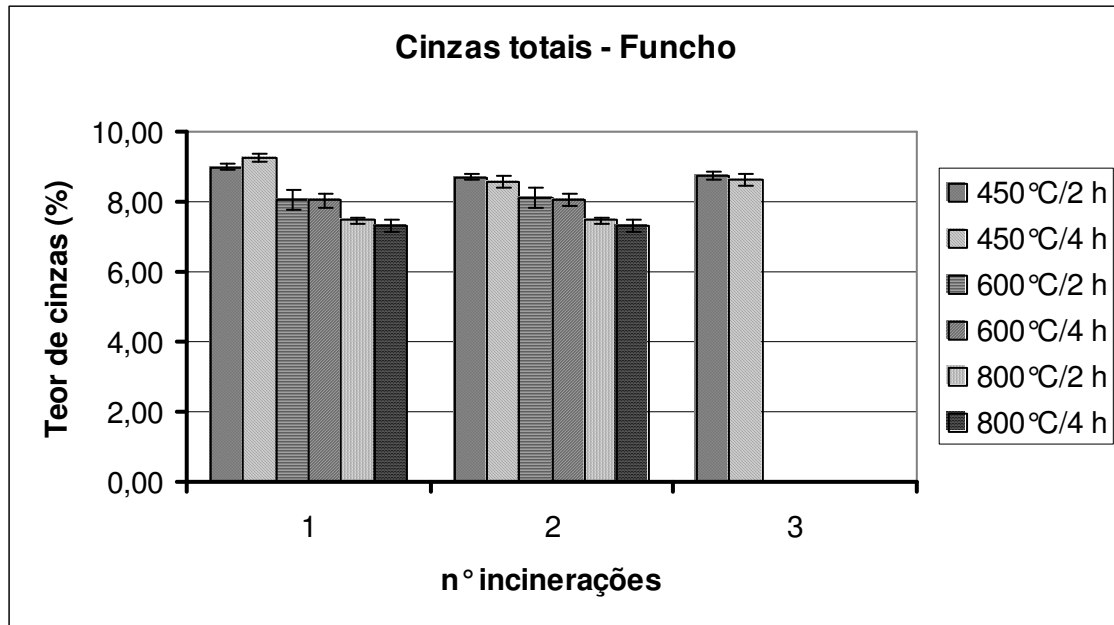
Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si (test-t student,  $p > 0,05$ )

A diferença entre o teor de cinzas totais e o teor de cinzas sulfatadas observada para o funcho foi de aproximadamente 50% em todas as análises realizadas.

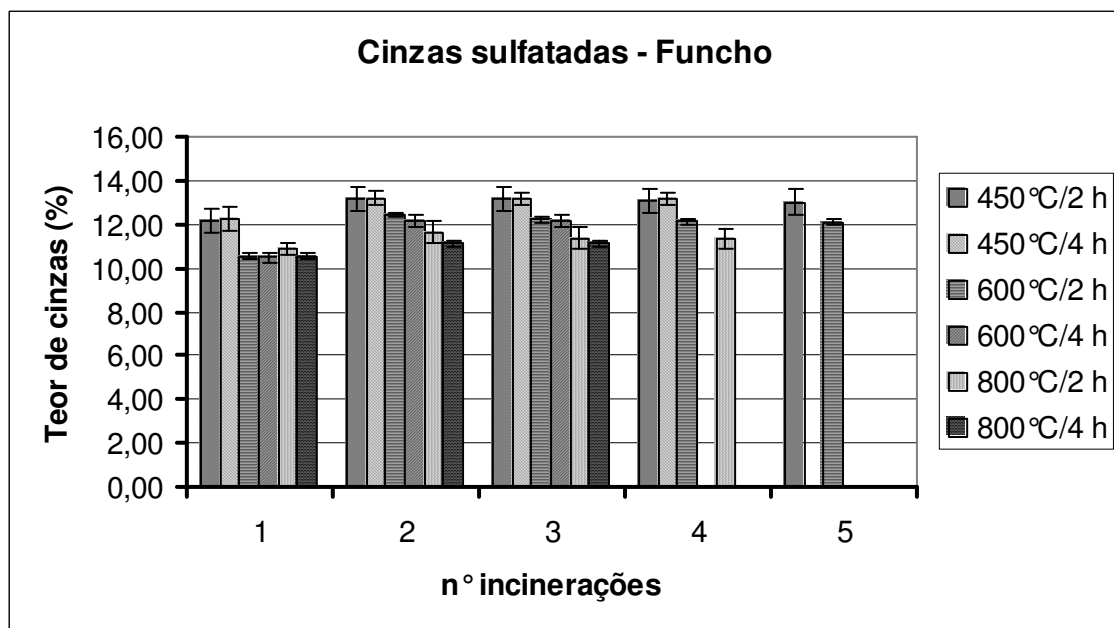
Para o funcho constatou-se também que a diferença entre os teores de cinzas totais a 450°C e a 800°C foi de quinze pontos percentuais em média, similar à diferença obtida para calêndula. No entanto as diferenças entre os teores de cinzas a 450°C e a 600°C e a 600°C e a 800°C não apresentaram a mesma tendência, as diferenças ficaram em torno de sete e oito pontos percentuais respectivamente.

Em relação ao teor de cinzas sulfatadas, as diferenças observadas entre os teores de cinzas, nas diferentes temperaturas empregadas, foram similares às diferenças verificadas na determinação de cinzas totais. O teor de cinzas sulfatadas a 450°C foi cerca de sete pontos percentuais superior ao obtido a 600°C e treze pontos percentuais superior ao obtido a 800°C. A 600°C o teor de cinzas sulfatadas obtido foi de aproximadamente seis pontos percentuais superior ao obtido a 800°C.

Os resultados obtidos através da determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas para o funcho, nas diferentes temperaturas e nos diferentes tempos de incineração, estão representados nas figuras 6.5 e 6.6.



**Figura 6.5:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal funcho, empregando-se diferentes tempo e temperaturas de incineração (n = 8).



**Figura 6.6:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas sulfatadas para a droga vegetal funcho, empregando-se diferentes tempo e temperaturas de incineração (n = 8).

Das quatro drogas vegetais analisadas, a marcela foi a única droga vegetal que apresentou características diferentes em relação ao tempo e temperatura de incineração empregados na determinação de cinzas. Quanto ao tempo de incineração, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o teor de cinzas totais obtido a 800°C ao empregar 2 h e 4 h, no entanto, nas demais temperaturas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para cinzas totais a 450°C/2 h e a 600°C/2 h, no entanto foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os demais resultados obtidos, em todas as demais temperaturas empregadas, tanto para cinzas totais quanto para cinzas sulfatadas (Tabela 6.5).

**Tabela 6.5:** Teores de cinzas (n = 8), para a droga vegetal marcela, obtidos através da determinação de cinzas totais (CT) e da determinação de cinzas sulfatadas (CS), empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração.

<b>Marcela</b>				
<b>Procedimento</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Ct<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b>Cs<sup>a</sup></b> $\bar{X} \pm DP$ CV (%)	<b><math>\Delta CS - CT</math></b> (%)
<b>1</b>	<b>450°C/2 h</b>	4,65 ± 0,15 <sup>b</sup> 3,20	7,01 ± 0,43 <sup>e,f</sup> 6,08	2,36 (50,75)
<b>2</b>	<b>450°C/4 h</b>	4,71 ± 0,19 4,02	7,11 ± 0,16 2,20	2,40 (50,96)
<b>3</b>	<b>600°C/2 h</b>	4,51 ± 0,13 <sup>c</sup> 2,81	5,86 ± 0,23 <sup>e,g</sup> 3,84	1,35 (29,93)
<b>4</b>	<b>600°C/4 h</b>	4,60 ± 0,22 4,69	6,06 ± 0,14 2,39	1,46 (31,74)
<b>5</b>	<b>800°C/2 h</b>	3,68 ± 0,12 <sup>b,c,d</sup> 3,26	5,35 ± 0,19 <sup>f,g</sup> 3,49	1,67 (45,38)
<b>6</b>	<b>800°C/4 h</b>	3,83 ± 0,11 <sup>d</sup> 2,99	5,47 ± 0,17 3,13	1,64 (42,82)

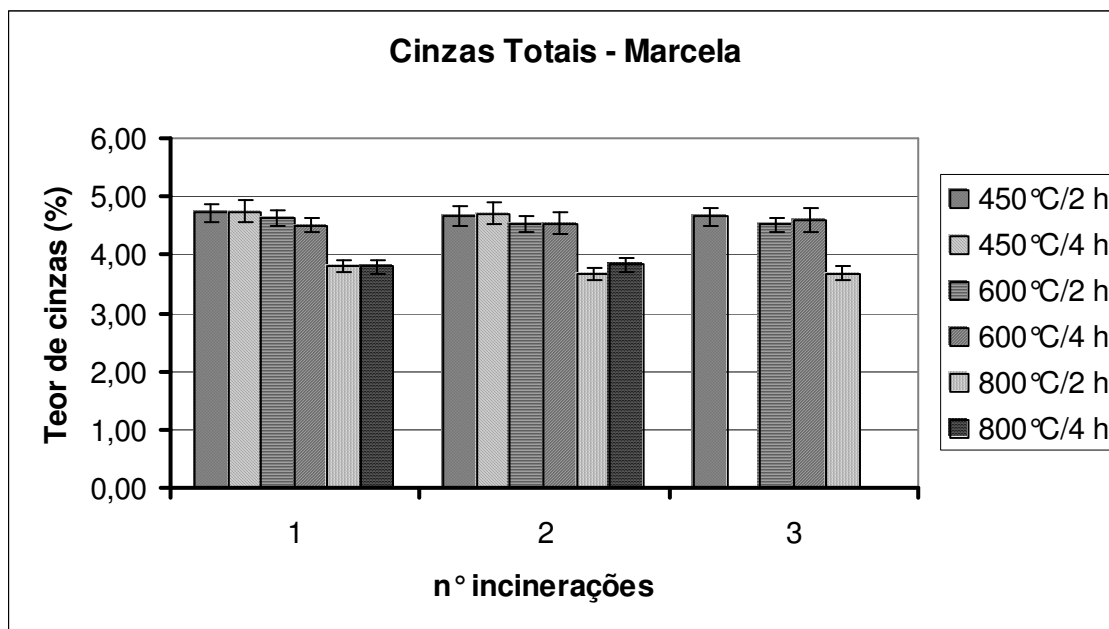
Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas entre si (teste-t Student, p<0,05)

Em relação às duas metodologias testadas, determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, verificou-se que a diferença entre os teores de cinzas obtidos

foi cerca de 30% menor a 600 °C. Nas demais temperaturas a diferença observada foi superior a 40%.

Ao analisar as diferenças entre os teores de cinzas totais e sulfatadas obtidos nas três temperaturas empregadas verificou-se uma certa similaridade com as diferenças observadas para a calêndula. O teor de cinzas totais obtido para marcela a 600 °C foi em média três pontos percentuais inferior ao obtido a 450 °C. A 800 °C o teor de cinzas totais foi cerca de vinte e um pontos percentuais inferior ao obtido a 450 °C e dezoito pontos percentuais inferior ao teor de cinzas obtido a 600 °C.

Em relação ao teor de cinzas sulfatadas, constatou-se uma diferença maior entre os teores de cinzas obtidos a 450 °C e a 600 °C, no entanto, a diferença a 600 °C e a 800 °C foi consideravelmente menor, a saber, a 800 °C o teor de cinzas sulfatadas obtido foi em média vinte e quatro pontos percentuais inferior ao obtido a 450 °C e apenas nove inferior ao obtido a 600 °C. O teor de cinzas sulfatadas obtido a 600 °C foi cerca de dezesseis pontos percentuais inferior ao teor de cinzas obtido a 450 °C.



**Figura 6.7:** Resultados obtidos através da determinação de cinzas totais, para a droga vegetal marcela, empregando-se diferentes tempos e temperaturas de incineração (n = 8).

Ao analisar as determinações de cinzas totais realizadas a 800°C/4 h (Figuras 6.1, 6.3, 6.5 e 6.7), pode-se verificar que o número de incinerações necessário para chegar a peso constante foi igual a dois para a maioria das análises realizadas. No entanto para todas as demais determinações foram necessárias três ou quatro incinerações até que as análises pudessem ser consideradas concluídas. Para a determinação de cinzas sulfatadas o número de incinerações necessário para chegar a peso constante, na maioria das análises realizadas, foi igual a quatro, no entanto, em alguns casos foram necessárias cinco incinerações e, em outros, apenas três incinerações foram suficientes.

Da mesma forma que o constatado no capítulo 4 (Determinação de água em matérias-primas vegetais), uma das maiores dificuldades encontradas para a determinação de cinzas, foi a necessidade de chegar ao peso constante. Obter uma diferença menor do que 0,5 mg entre duas pesagens sucessivas, para todos os oito cadinhos de cada uma das amostras, é bastante difícil, principalmente ao levar em consideração as condições climáticas do país.

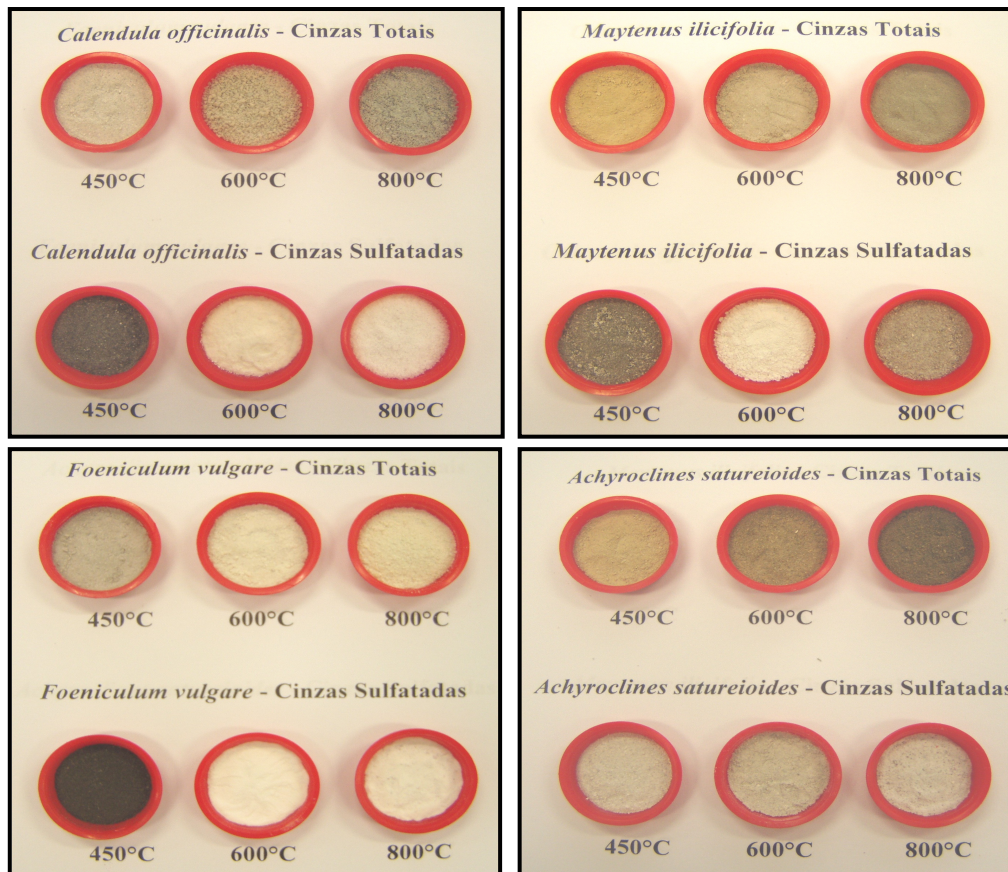
Quanto aos desvios padrões (Tabelas 6,3 a 6,6), observou-se que os valores obtidos nas determinações de cinzas sulfatadas foram em geral maiores que os obtidos nas determinações de cinzas totais. Além disso, em ambas as metodologias verificou-se que na maioria dos casos, quanto maior a temperatura e o tempo de incineração, menor era o desvio padrão.

Nos gráficos da determinação de cinzas sulfatadas observou-se um fato curioso. Em algumas das análises realizadas verificou-se um aumento no teor de cinzas sulfatadas após a segunda incineração. Para calêndula (Figura 6.2) pode-se observar que houve um aumento no teor de cinzas após a primeira incineração, para as análises realizadas a 450°C/2 h e 800°C/2 h. O mesmo foi observado para marcela, nas análises realizadas a 450°C/2 h, 600°C/4 h, 800°C/2 h. Para espinheira-santa e para o funcho esse aumento foi observado em todas as análises realizadas (Figura 6.4 e 6.6, respectivamente). Acredita-se que este fato está relacionado com o volume da amostra pesado e a quantidade de ácido sulfúrico adicionada para o tratamento da amostra. Cabe ressaltar que, para a maioria das amostras analisadas, 2 mL de ácido sulfúrico não foram suficientes para umidecer

de forma homogênea a quantidade da droga vegetal pesada. Isto explica também o maior desvio padrão observado na determinação de cinzas sulfatadas.

Quanto à diferença observada entre o teor de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, sabe-se que a diferença está relacionada com a transformação dos oxalatos, haletos e carbonatos em sulfatos. A diferença entre os teores de cinzas totais e sulfatadas observados, de cerca de 50%, comprova a não equivalência das duas metodologias. Embora Evans (1996) relate que o tratamento das cinzas com ácido sulfúrico favorece a formação de cinzas mais consistentes e mais estáveis a temperaturas elevadas (600 °C), os resultados apresentados mostram menor reprodutibilidade para a determinação de cinzas sulfatadas, em comparação com a determinação de cinzas totais, devido ao maior número de incinerações necessárias. Cabe ressaltar que, na grande maioria das monografias de plantas encontradas nas farmacopéias consultadas, há somente especificação para o teor de cinzas totais.

Além das diferenças observadas entre os teores de cinzas, tanto na determinação de cinzas totais quanto na determinação de cinzas sulfatadas, verificaram-se também diferenças na coloração dos resíduos de cinzas obtidos nas diferentes temperaturas empregadas para a realização das análises (Figuras 6.8). Isto confirma a influência da temperatura empregada sobre o teor de cinzas obtido, sugerindo também a existência de algum tipo de influência sobre a composição dos constituintes inorgânicos presentes nesses resíduos. Segundo Hartke e Mutschler (1986), na determinação de cinzas totais, mesmo ao empregar 600 °C como temperatura de incineração, eventualmente, não se obtêm cinzas brancas devido a formação de uma camada de sais fundidos sobre as partículas de carbono.



**Figura 6.8:** Coloração dos resíduos de cinzas obtidos na determinação de cinzas totais e sulfatadas, para calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela, empregando-se duas horas como tempo inicial de incineração e 450°C, 600°C e 800°C como temperaturas de incineração.

Cabe ressaltar que não foi possível determinar a melhor temperatura de incineração para a determinação de cinzas, pois foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre todas as análises realizadas nas diferentes temperaturas empregadas. No entanto, ao considerar os gastos relativos a temperatura de incineração empregada, a volatilização dos constituintes inorgânicos, os resultados obtidos, o número de incinerações necessário para que a análise seja considerada concluída, bem como a própria coloração dos resíduos de cinzas obtidos, pode-se sugerir que a temperatura mais apropriada para a determinação de cinzas totais é 600°C. Tal sugestão decorre da observação dessa recomendação na Farmacopéia Européia (2002), a qual é o código oficial estabelecido a partir dos diferentes países europeus.



### 6.5.2 Determinação de metais pesados

Através da revisão das metodologias para a determinação de metais pesados por absorção atômica, verificou-se a possibilidade de preparação das amostras através de diferentes métodos. Tünzen (2003) realizou a determinação de metais pesados em amostras de solo, cogumelos e plantas por absorção atômica, comparando diferentes técnicas de preparação das amostras (cinzas secas, cinzas úmidas e digestão por microondas). Segundo os resultados obtidos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três modos de preparação das amostras, embora os desvios padrões obtidos para a digestão por microondas tenha sido menor.

Ao considerar a determinação de cinzas um quesito farmacopéico para o controle de qualidade de drogas vegetais, realizou-se a determinação da constituição química dos resíduos de cinzas, através dos metais Pb, Cd, Co, Mn e Ni, por absorção atômica, com o intuito de verificar a aplicabilidade da utilização dos mesmos na determinação de metais pesados em matérias-primas vegetais.

Além disso, não tendo sido possível determinar a melhor temperatura de incineração a ser empregada para a determinação de cinzas, através da análise estatística dos resultados obtidos, esperava-se que a determinação da composição química das cinzas, obtidas nas diferentes temperaturas empregadas, pudesse fornecer subsídios adicionais aos resultados encontrados.

Nas tabelas 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9 são apresentados os teores de cinzas, em percentagem, encontrados para as matérias-primas vegetais calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela, através da determinação de cinzas totais e de cinzas sulfatadas, empregando-se diferentes temperaturas de incineração, juntamente com os resultados obtidos por meio da determinação de metais pesados nos resíduos de cinzas, realizada por espectroscopia de absorção atômica, em ppb (partes por bilhão). Para a melhor visualização esses resultados são também apresentados através de gráficos na figuras 6.10 até 6.17. Cabe chamar a atenção para a diferença de escala para o elemento manganês.

**Tabela 6.6:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula ao empregar diferentes temperaturas de incineração.

<b>Calêndula</b>						
<b>Temp/tempo</b>	<b>CT (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	7,60	18,8	15,3	3,1	22,7	747,8
600 °C/2 h	7,38	15,9	13,6	2,4	16,7	459,6
800 °C/2 h	6,28	25,2	17,2	4,2	24,2	677,1
<b>Temp/tempo</b>	<b>CS (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	11,52	35,8	12,9	4,2	23,1	466,6
600 °C/2 h	9,34	40,8	17,1	2,8	107,8	666,8
800 °C/2 h	9,10	37,1	24,6	4,5	87,7	343,6

**Tabela 6.7:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa ao empregar diferentes temperaturas de incineração.

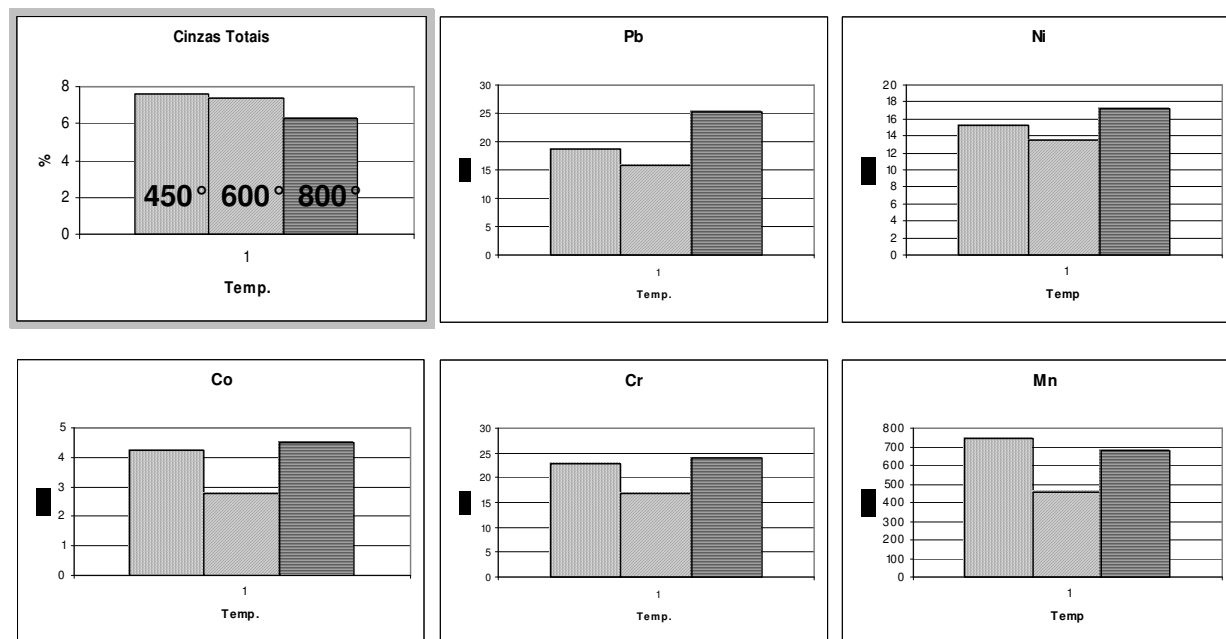
<b>Funcho</b>						
<b>Temp/tempo</b>	<b>CT (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	5,76	48,1	15,0	3,7	20,3	8443,3
600 °C/2 h	3,99	45,9	14,4	3,3	14,4	7678,3
800 °C/2 h	3,44	74,1	28,4	4,5	22,8	12050,1
<b>Temp/tempo</b>	<b>CS (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	8,08	41,0	11,3	4,8	13,8	4632,9
600 °C/2 h	7,13	37,4	13,1	3,6	35,3	6358,0
800 °C/2 h	6,79	39,6	9,8	3,0	12,3	6071,8

**Tabela 6.8:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal funcho ao empregar diferentes temperaturas de incineração.

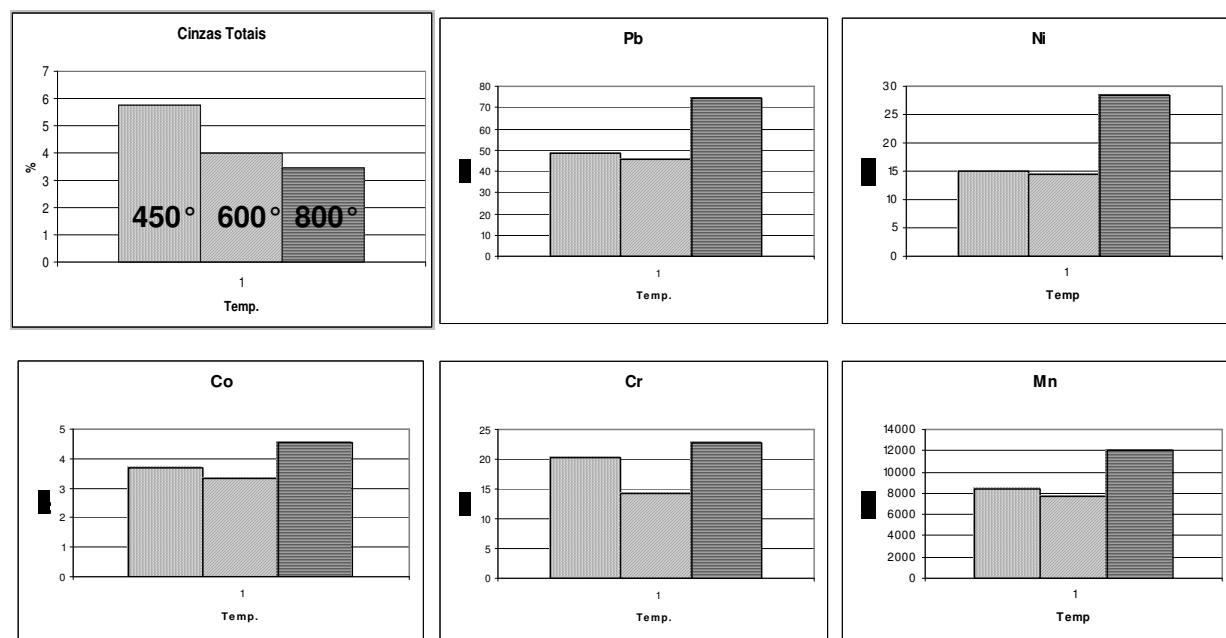
<b>Funcho</b>						
<b>Temp/tempo</b>	<b>CT (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	8,74	38,4	34,7	4,1	43,4	500,9
600 °C/2 h	8,09	35,6	19,6	3,4	33,5	331,6
800 °C/2h	7,46	61,9	26,3	5,2	46,0	420,4
<b>Temp/tempo</b>	<b>CS (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	13,03	33,7	12,3	2,5	26,1	242,6
600 °C/2 h	12,10	37,9	16,7	3,4	34,9	339,7
800 °C/2 h	11,33	47,4	19,8	3,4	39,6	196,0

**Tabela 6.9:** Teores de cinzas totais (CT), cinzas sulfatadas (CS), em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal marcela ao empregar diferentes temperaturas de incineração

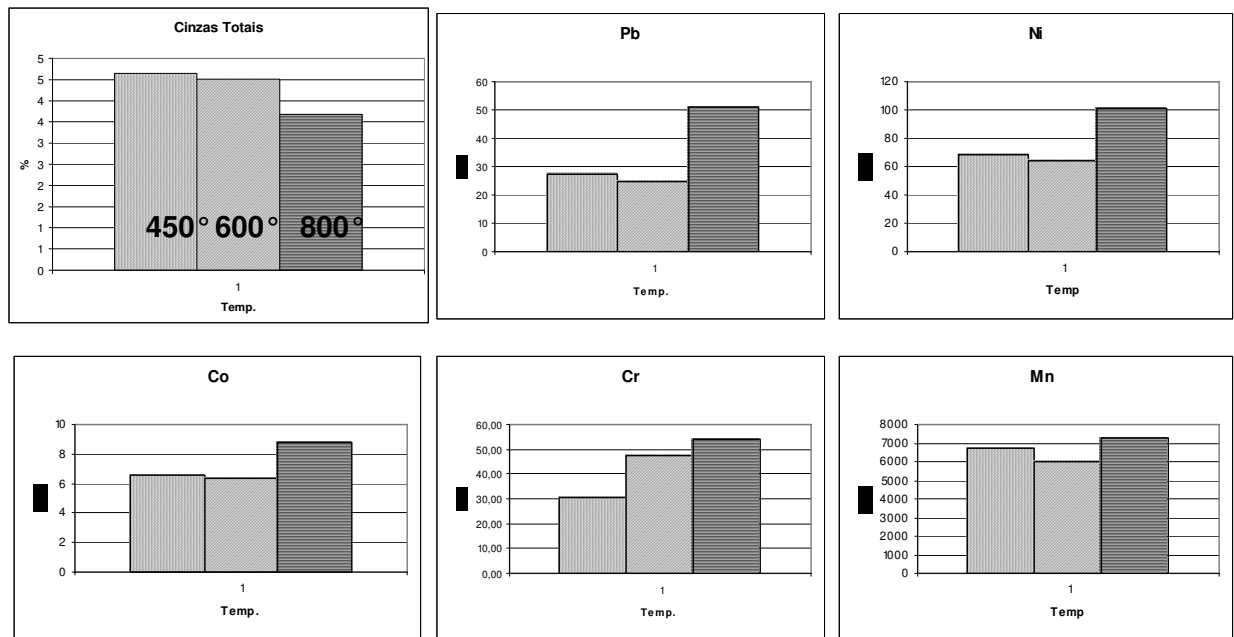
<b>Temp/tempo</b>	<b>CT (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	4,65	27,5	68,0	6,5	30,7	6736,1
600 °C/2 h	4,51	24,9	63,9	6,4	47,3	5982,2
800 °C/2 h	3,68	50,9	101,0	8,8	53,7	7275,4
<b>Temp/tempo</b>	<b>CS (%)</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>
450 °C/2 h	7,01	39,9	47,7	6,6	34,6	3981,0
600 °C/2 h	5,86	33,0	31,4	4,6	36,6	6808,1
800 °C/2 h	5,35	31,2	42,3	8,3	25,7	5182,9



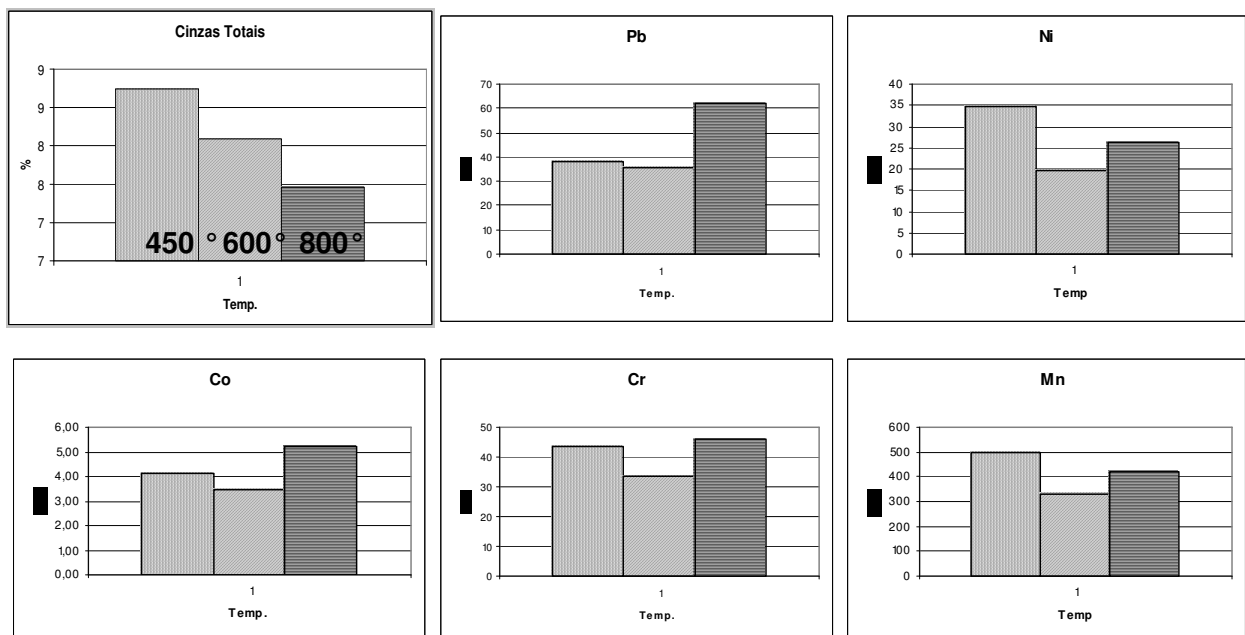
**Figura 6.9:** Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula ao empregar ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.



**Figura 6.10:** Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal funcho ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.



**Figura 6.11:** Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.

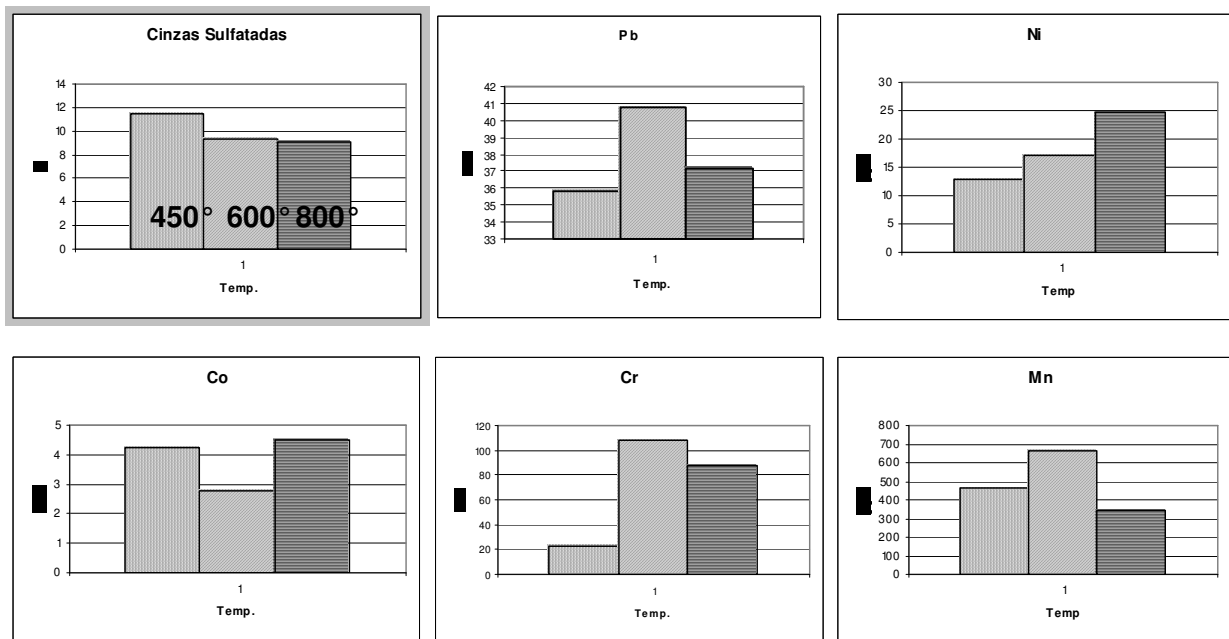


**Figura 6.12:** Teores de cinzas totais, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal marcela ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.

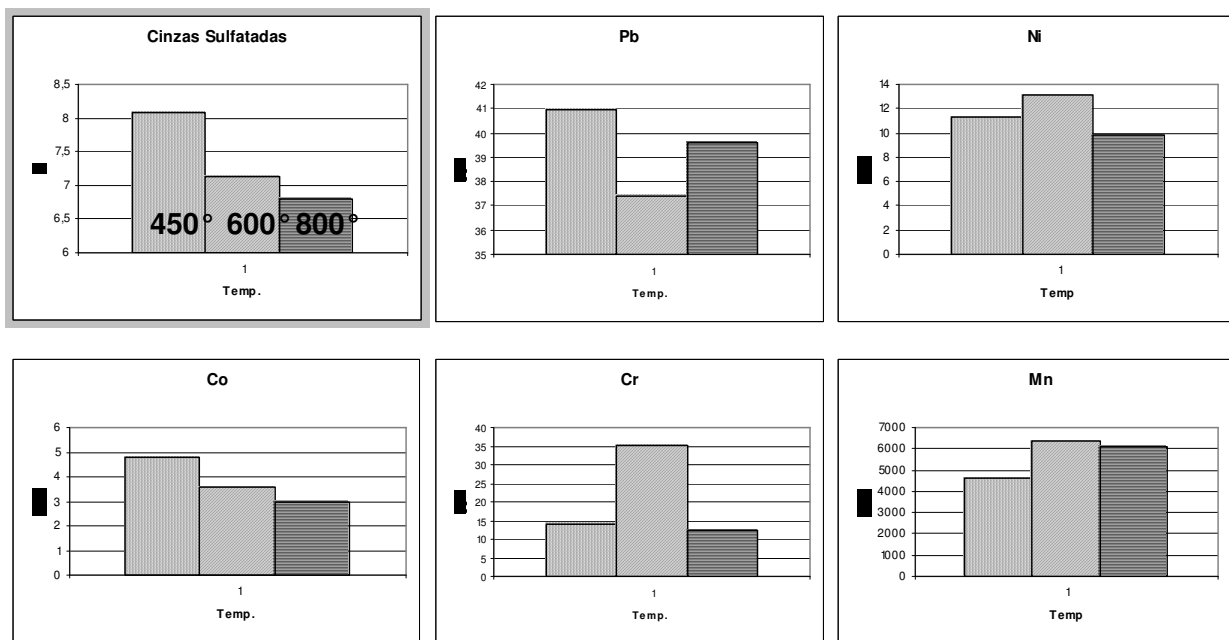
Ao analisar as figuras acima pode-se observar que os teores de cinzas totais obtidos para calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela, diminuem com o aumento da temperatura.

Quanto aos constituintes inorgânicos, verificou-se que os valores obtidos são aproximadamente da mesma ordem de grandeza, quando analisados separadamente (Tabelas 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9). Entre os constituintes analisados, verificou-se que para as quatro matérias-primas vegetais analisadas, os valores encontrados para o manganês foram bem maiores do que os obtidos para os demais constituintes. Enquanto os valores encontrados para o manganês ficaram em torno de 600 ppb, todos os demais elementos ficaram abaixo de 30 ppb, nas determinações de metais pesados realizados com os resíduos de cinzas totais das amostras de calêndula, por exemplo. Cabe chamar a atenção para o fato desses valores serem referentes ao teor dos elementos nas cinzas, por isso, de modo geral, são valores bem menores do que aqueles referidos na literatura para material vegetal (geralmente da ordem de ppm).

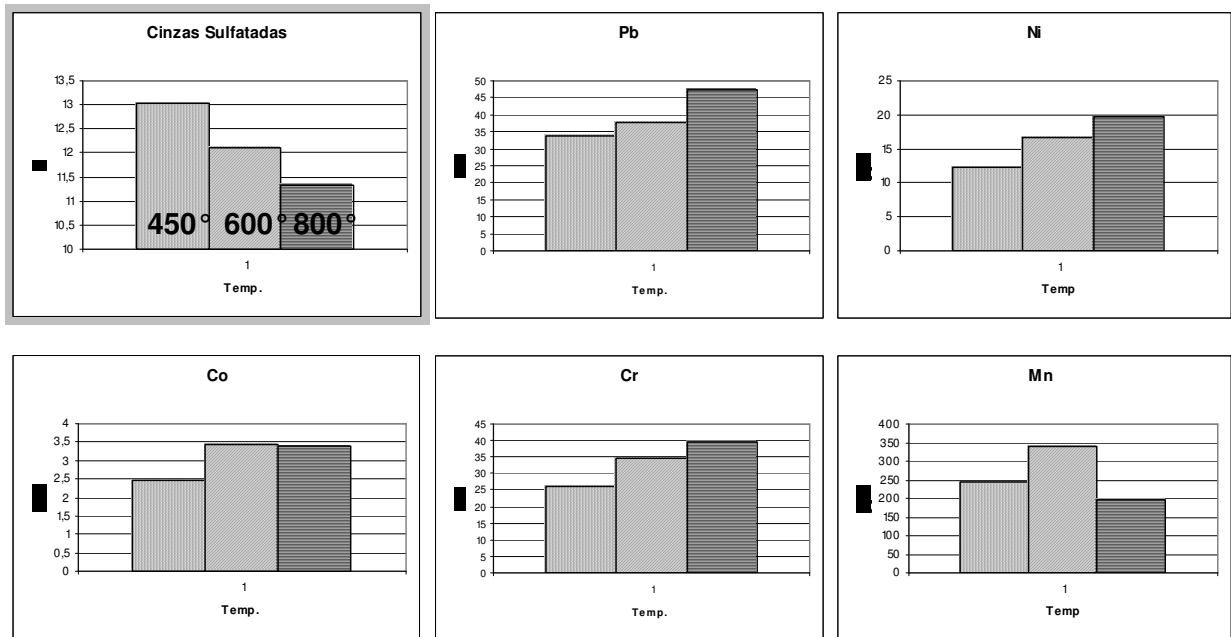
A diminuição observada no teor de cinzas totais, a 450°C e a 600°C, também foi verificada ao comparar os valores da determinação de metais pesados nos resíduos de cinzas obtidos, para as quatro espécies analisadas; com exceção da determinação de cromo no resíduo de cinzas totais da espinheira-santa, onde se verificou um aumento substancial desse metal a 600°C. No entanto, a 800°C observou-se um aumento considerável nos teores dos constituintes inorgânicos pesquisados na maioria das análises realizadas. Acredita-se que este aumento pode estar relacionado com a diminuição do resíduo de cinzas obtido a esta temperatura, o que levaria a um aumento na concentração dos constituintes inorgânicos pesquisados, sugerindo ainda, a presença de outros constituintes inorgânicos, além dos analisados, que não tinham sido volatilizados a 450°C e a 600°C.



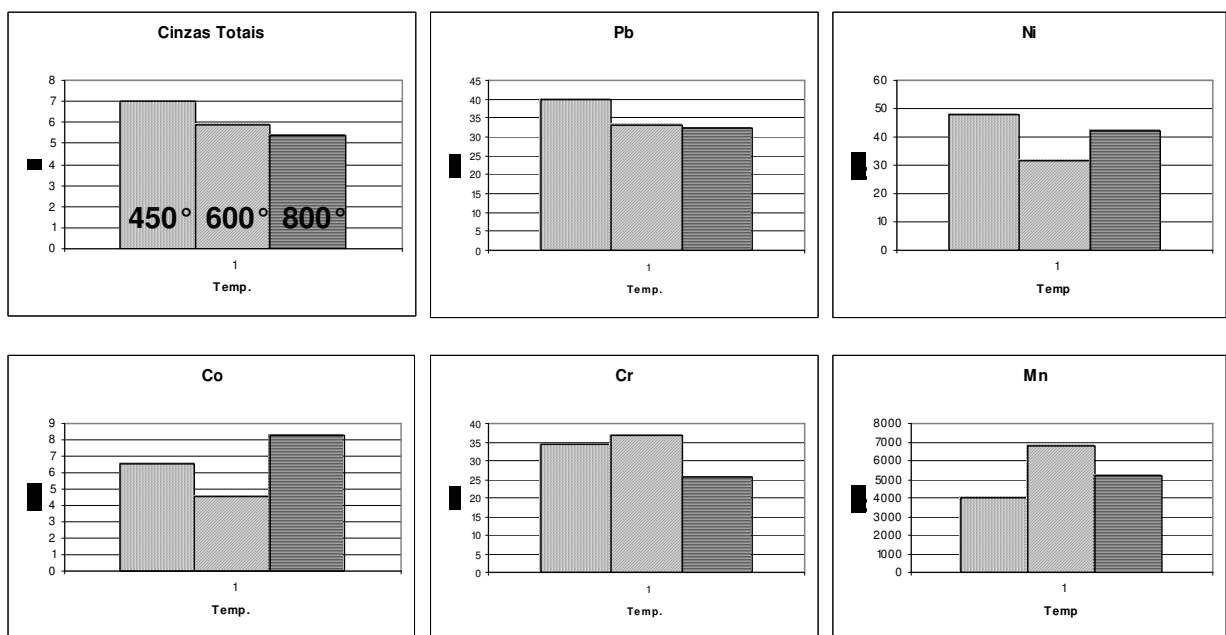
**Figura 6.13:** Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.



**Figura 6.14:** Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal espinheira-santa ao empregar 450, 600 e 800°C como temperatura de incineração.



**Figura 6.15:** Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal funcho ao empregar 450, 600 e 800 °C como temperatura de incineração.



**Figura 6.16:** Teores de cinzas sulfatadas, em percentagem, e teores dos constituintes inorgânicos (Pb, Ni, Co, Cr e Mn), em ppb, obtidos para a matéria-prima vegetal marcela ao empregar 450, 600 e 800 °C como temperatura de incineração.



Quanto a determinação de metais pesados nos resíduos de cinzas sulfatadas, obtidos ao empregar 450 °C, 600 °C e 800 °C como temperatura de incineração, não foram observadas tendências claras para os valores obtidos. Através da figura 6.14 pode-se observar que na determinação de metais pesados nos resíduos de cinzas sulfatadas, obtidos para a matéria-prima vegetal calêndula, o teor de chumbo foi maior a 600 °C e o menor a 450 °C. Para o níquel observou-se que o teor obtido foi maior nos resíduos de cinzas determinados a 800 °C, e o menor a 450 °C. O maior e o menor teor de cobalto foi verificado para os resíduos de cinzas obtidos a 800 °C e a 600 °C, respectivamente. Diferentes variações foram observadas para os demais metais analisados, assim como para os resíduos de cinzas sulfatadas obtidos para as matérias-primas vegetais espinheira-santa, funcho e marcela.

Tais variações podem estar relacionadas com o comportamento diferenciado dos diferentes sulfatos e ainda com a formação de piro-sulfatos (HARTKE; MUTSCHLER, 1986). Por outro lado, pode-se chamar a atenção para a possível contaminação introduzida pelo uso de reagente em grau de pureza não adequado, embora tenha sido utilizada sempre a mesma quantidade, no caso ácido sulfúrico utilizado deveria ter seu teor de cinzas aferido.

## 7 CONCLUSÕES

- Através da comparação dos diferentes sistemas cromatográficos testados e, considerando-se também as diferentes soluções amostras preparadas, estabeleceu-se o perfil cromatográfico mais adequado para a caracterização das drogas vegetais em análise. Caracterizou-se a aplicabilidade do método para a identificação dessas matérias-primas vegetais e para a análise de sua pureza, fato já relatado por outros autores.
- A utilização de técnicas microanalíticas para a determinação de sujidades leves mostrou-se uma técnica passível de aplicação na análise de matérias-primas vegetais, no entanto, é necessário o estabelecimento de especificações quanto ao limites máximos aceitáveis, dependendo do destino que será dado ao material vegetal.
- Na avaliação da qualidade microbiológica, verificou-se que, embora apenas a amostra de passiflora tenha apresentado níveis de contaminação acima do especificado para o uso na forma de chás e infusões, todas as demais espécies analisadas apresentaram níveis de contaminação bem próximos ao limite máximo especificado para uso interno. Conclui-se portanto, que mais estudos devem ser realizados com o intuito de avaliar a qualidade das drogas vegetais atualmente comercializadas.
- Não foi possível estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos através da determinação de materiais estranhos e de sujidades leves em relação a contaminação microbiológica.
- Para as drogas vegetais analisadas que não contém óleos voláteis não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os resultados obtidos através da “Determinação de água em drogas vegetais”, “Determinação de água por destilação azeotrópica” e “Determinação da perda por dessecação”.

- Na determinação da perda por dessecação não foi possível chegar a peso constante (diferença menor do que 0,5 mg entre duas pesagens consecutivas). Por outro lado, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os teores de umidade obtidos ao considerar a análise concluída quando a diferença entre duas pesagens sucessivas foi menor que 1 mg e 5 mg.
- Em relação à determinação de água em analisador de umidade os resultados obtidos, comparado aos resultados do método farmacopéico, mostraram-se exatos e precisos, para as matérias-primas vegetais analisadas, o que caracterizou a validade do método proposto.
- Ao comparar os resultados obtidos para a determinação de cinzas totais e cinzas sulfatadas nas drogas vegetais, calêndula, espinheira-santa, funcho e marcela, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas ao empregar 2 e 4 horas, no entanto, em relação às temperaturas de incineração foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as três temperaturas empregadas (450 °, 600 °e 800 °C).
- Em relação à determinação de cinzas sulfatadas verificou-se que o teor de cinzas obtido é cerca de 50% superior ao obtido através da determinação de cinzas totais. Além disso, é necessário um número maior de incinerações para que a análise possa ser considerada concluída. Verificou-se que o coeficiente de variação obtido foi maior do que o verificado na determinação de cinzas totais.
- Na determinação de cinzas, assim como na determinação de perda por dessecação, em matérias primas vegetais, verificou-se a dificuldade de se chegar a peso constante.
- Em relação a aplicabilidade da utilização do resíduo de incineração para a determinação de metais pesados em matérias-primas vegetais, mais estudos precisam ser realizados de modo a verificar se o teor de metais encontrados nos resíduos é proporcional ao teor de metais pesados presentes no material vegetal propriamente dito.

## 8 REFERÊNCIAS

ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER, M. S.; TANTAWY, EI.; BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, p. 357-363, 1999.

AHMED, M. S.; FONG, H. H. S.; SOEJARTO, D. D.; DOBBERSTEIN, R. H.; WALLER, D. P. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography**, v. 213, p. 340-344, 1981.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMANI, K.; TAMURA, T. Triterpenealcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. **Planta Medica**, v. 54, p. 1255-1260, 1996.

ALBERTON, M. D.; FALKENBERG, M. B.; FALKENBERG, D. B.; SOUZA, E. S. Identificação de marcadores cromatográficos de *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* para o controle de qualidade da espinheira-santa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 09-11, 2002.

ALBERTON, M. D.; FALKENBERG, D. B.; FALKENBERG, M. B. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 11-13, 2002.

ALBERTON, M. D. **Investigação fitoquímica de *Zollernia ilicifolia* (Brongniart) Vogel (FABACEAE): contribuição ao controle de qualidade de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*)**. 2001. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ALEXANDRE, R. F. **Fitoterapia Baseada em Evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina**. 2004. 408 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A.B.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas da medicina popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1995. p. 117.

ALONSO, V.; MONFORTE, M. T.; TUMINO, G.; RAGUSA, S.; BISIGNANO, G. A note on the microbial contamination of medicinal plants. **Pharmeuropa**, v. 6, n. 1, p. 48-56, 1994.

ANDREWS, J. H.; KENERLEY, C. M.; NORDHEIM, V. Positional variation in Phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. **Microbiology**

**Ecology**, v. 6, p. 71, 1980 apud ALONSO, V.; MONFORTE, M. T.; TUMINO, G.; RAGUSA, S.; BISIGNANO, G. A note on the microbial contamination of medicinal plants. **Pharmeuropa**, v. 6, n. 1, p. 48-56, 1994.

**AOAC**. Official methods of analysis of AOAC International. 17. ed. Gaithersburg, USA. Cap. 16, 2000.

ARAÚJO, A. L. A; OHARA, M. T. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras de São Paulo e de infusos derivados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p. 129-137, 2000.

BARBIERI, M. K.; ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. de; CARDOZO, G. M. B. Q. **Microbiologia em alimentos**: identificação histológica e material estranho. 2. ed. Campinas: CIAL/ITAL, 2001. 151 p.

BERNTSSON, O.; ZACKRISSON, G.; ÖSTLING, G. Determination of moisture in hard gelatin capsules using near-infrared spectroscopy: applications to at-line process control of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 895-900, 1997.

BISSET, N. G. (ed.) **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals**: a handbook for practice on a scientific basis. London: Boca Raton, Stuttgart: Medpharm Scientific, 1994.

BLUMENTAL-BARBY, K.; BALCK, K. Die Stellung der Arzneipflanzen in Gesundheitsverhalten der Bevoelkerung der DDR. **Pharmazie**, v. 41, n. 8, p. 594-595, 1986.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINKMANN, J. **Herbal Medicine**: Expanded Commission E monographs. Austin: American Botanical Council, 2000. p. 293-296.

BORROR, D. J.; DeLONG, D. M. **Introdução ao estudo dos Insetos**. São Paulo: Edgard Blucher, 1988.

BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C. D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, n. 2, p. 693-700, 1998.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Resolução – RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em 10 mar. 2003.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamenta o registro de produtos fitoterápicos no Brasil. Portaria n° 6, de 31 de Janeiro de 1995. Disponível em: [http://anvisa.gov.br/legis/portarias/6\\_95.htm](http://anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm). Acesso em: 14 dez. 2004.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução - RDC n° 17, de 24 de Fevereiro

de 2000. Disponível em: <[http://anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm)>. Acesso em: 14 dez. 2004.

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução - RDC n° 48, de 16 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>. Acesso em: 28 mar. 2005

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution à l'étude pharmacognostique de la Passiflore. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 39, p. 15-22, 1984.

**BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA.** 4. ed. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1996.

BROUSSALIS, A.M.; FERRATO, A.; GURNI, A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 8, n. 11, p. 11-16, 1989.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie: Phytochimie Plantes Médicinales.** 2. ed. Paris: Lavosier, 1993.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO. C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. 58-65, 2000.

CARLINI, E. A.; MACAUBAS, C. I, P.; OLIVEIRA, M. G. M. de; BARBOSA, V. P. Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. A. (Coord.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME/AFIP, p. 21-36, 1988.

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus sp* (Espinheira-santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos: In: CARLINI, E. A. (Coord.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília:CEME/AFIP, p. 21-36, 1988.

CARLINI, E. A.; FROCHTENGARTEN, M. L. Toxicologia Clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. A. (Coord.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME/AFIP, p. 21-36, 1988;

CASTRILLO, J. L.; CARRASCO, L. Action of 3-methylquercetin on poliovirus RNA replication. **Journal of Virology**, v. 61, n. 10, p. 3319-3321, 1987.

CHIRIANI, C. H. B. **La vuelta a los vegetales:** tratado moderno de fitoterapia. 6 ed. Argentina: Hachette, 1974.

CHOI, D. W.; KIM, J. H.; CHO, S. Y.; KIM, D. H.; CHANG, S. Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, v. 181-182, p. 581-586, 2002.

- CIPRIANI, T. R.; MELLIGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 703-706, 2003.
- CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. I. Doces de frutas em pasta. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 85-90, 2002.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1986.
- CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5 ed. Rio de Janeiro: Bertrand, 1995.
- DE CARO, C. A.; AICHERT, A.; WALTER, C. M. Efficient, precise and fast water determination by the Karl Fischer Titration. **Food Control**, v. 12, p. 431-436, 2001.
- De MEYER, N.; HAEMERS, A.; MISHRA, L.; PANDEY, H. K.; PIETERS, L. A. C.; VANDEN BERGUE, D. A.; VLIETINCK, A. J. 4'-hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 736-746, 1991.
- DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISAAC, O. The Role of Triterpenoids in the Anti-inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.
- DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 31, p. 1163-1170, 1998.
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 10. Auf. Stuttgart: Deutscher Apotheker, Eschborn: Govi, 1991
- DI STASI, L.C.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; GONZALEZ, F.G. Estudo farmacológico comparativo de adulterantes da espinheira-santa: *Maytenus aquifolium* M., *Sorocea bonplandii* (Baill). B. L. B. e *Zollernia ilicifolia* Vog. In: **IV Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 1999, Ribeirão Preto – SP. P. 107. ref. 9.09. Resumo.
- EFUNTOYE, M. O. Fungi associated with herbal drug plants during storage. **Mycopathologia**, v. 136, n. 2, p. 115-118, 1996-1997. Abstract-Medline.
- ESGOP. **Monographs on the medicinal uses of plant drugs**, Fascicule 1. Elburg: European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 1996.
- EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders Company, 1996.
- FALKENBERG, M. de B., SANTOS, R. I. dos., SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.;

MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC. 2004.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC. 2004.

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929, p. 574-575.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3 ed. São Paulo:Andrei, p.839-840, 1977.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988a. Métodos físico e físico-químicos.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988b. Métodos biológicos.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 2000b. Métodos de farmacognosia.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Fascículo 2. São Paulo: Atheneu, 2000a. Monografia: funcho.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Fascículo 3. São Paulo: Atheneu, 2001a Monografia: calendula.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Fascículo 3. São Paulo: Atheneu, 2001b Monografia: macela.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Fascículo 4. São Paulo: Atheneu, 2002. Monografia: espinheira-santa.

European Pharmacopoeia. 4 ed. Strasbourg: European department for the Quality of Medicines. 2002.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII. Volume 1. Ministério da Saúde. Lisboa: Infarmed, Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. 2002a.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII. Volume 2. Ministério da Saúde. Lisboa: Infarmed, Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. 2002b.



- FDA.** U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Technical Bulletin 5: macroanalytical procedures manual, 1984. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition. Eletronic Version 1998. Disponível em : <<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/mpm-toc.html>>. Acesso em abril de 2004.
- FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, vol. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.
- FISCHER, D. C. H.; OHARA, M. T.; SAITO, T. Contaminação microbiana em medicamentos fitoterápicos sob a forma sólida. **Revista Brasileira de Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n. 2, p. 81-88, jul/dez., 1993.
- GEIGER, H., MARKHAM, K. R. The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift-fur-Naturforschung**, v. 41c, p. 949-950, 1986 apud QIMIN. L.; VAN DEN HEUVEL, H.; ZO, O.; CORTHOUT, J.; PIETERS, A. C.; VLIETINCK, A. J.; CLAEYS, M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography**, v. 562, p. 435-446, 1991.
- GEOCZE, S.; VILETA, M. P.; CHAVES, B. D. R.; FERRARI, A. P. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com Preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. A. (Coord.). **Estudo de ação antiúlcera fástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME/AFIP, p. 21-36, 1988;
- GONÇALVES, M. I. dos A.; MARTINS, D. T. de O. Plantas medicinais usadas pela população do município de Santo Antonio de Leverger. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 3-4, p. 56-61, 1998.
- GONZALÉZ-ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P.; ATHAYDE, M. L.; MENTZ, L. A. Brasilianische Phytotherapeutika. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 129, n. 35, p. 1847-1848, 1989.
- GRAVEL, I. V.; YAKOVLEV, G. P.; PETRPOV, N. N.; STULOUSKII, S. S.; LISTOV, S. A. Content of heavy metals in some species of medicinal plants in the Altaishii Krai. **Rastitli' nye-Resursy**, v. 30, n. 1-2, p. 108, 1994 apud ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER, M. S.; TANTAWY, EI.; BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, p. 357-363, 1999.
- GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A.; GRIFFITHS, L. R. Identification and simultaneous analysis of harmine, harmine, harmol, isovitexina, and vitexina in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Cromatography and Related Technologies**, v. 24, p.2513-2523, 2001.
- GUPTA, M. P. (ed) 270 **Plantas medicinales iberoamericanas**. Panamá: CYTED, 1996.
- HALBACH, G. Grenzen der Analytik Pflanzlicher Arzneibereitung. **Deutsche Apotheker Zeitung**. Stuttgart: Wissenschaftliche, p. 305-306, 1983 apud SOARES, L.

**Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia Alba* (Miller) N. E. Brown Britt. & Wills (falsa-melissa) – Verbenaceae.** 2001. 189 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HARTKE, K; MUTSCHLER, E. (Hrsgb) **Deutsches Arzneibuch 9-Kommentar.** Stuttgart: Wissenschaftliche, Frankfurt: Govi, 1986.

HIRSCHMANN, G. S. The constituents of *Acyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, n. 3, p. 134-135, 1984.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGRE-008. março, 2003.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Guidance on validation of analytical procedures: Methodology.** London: EMEA. 1998.

ISENGARD, H. -D.; SCHULTHEIß, D.; RADOVIÉ, B.; ANKLAM, E. Alternatives to official analytical methods used for the water determination in honey. **Food Control**, v. 12, p. 459-466, 2001.

ISENGARD, H. -D.; FÄRBER, J. -M. 'Hidden parameters' of infrared drying for determining low water contents in instant powders. **Talanta**, v. 50, p. 239-246, 1999.

ISENGARD, H. -D.; PRÄGER, H. Water determination in products with high sugar content by infrared drying. **Food Chemistry**, v. 82, p. 161-167, 2003.

ISENGARD, H.-D. Rapid water determination in foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 155-162, 1995.

ISSAC, O. **Die Ringelblume:** Botanik, Chemie, Pharmakologie, Toxicologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1992.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, 1991

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; ICHITSUKA, K.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Oligonicotininated sesquiterpenes polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1479 – 1485, 1993.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Cangorins F-J, five additional oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p. 460-470, 1994.

KALOGA, M.; HÄNSEL, R., CYBULSKI, E. M. Isolierung eines Kawapyrons aus *Achyroclines satureioides*. **Planta Medica**, v. 48, p. 103-104, 1983.

KITAGAWA, T.; UMEYAMA, Y.; HIRATA, K.; KODA, S. Studies on Residue on Ignition Test in JP. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 122, n. 1, p. 121-125, 2002.

KOLODJE, H. **Beitragur Kenntnis polyphenolischer Inhaltsstoffe in *Nelia meyeri* Schwant**, 1980. p. 30. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de Münster, Alemanha.

LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; SCHENKEL, E. P.; SANTOS, M. A.; BASSANI, V. L. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.3, p. 317-321, 1991.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEUNG, F.; FOSTER, A. Y.; FOSTER, L. **Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, p. 240-243, 1996.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, p. 1-18, 2004.

LIMA, C. S. A. **Estudo químico e biológico de *Achyrocline satureioides* DC.** 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco, apud BETTEGA, J. M. P. R. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Astereceae – marcela.** 2000. 99 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LIST, P.; SCHMIDT, P. C. Quality assurance of phytopharmaceuticals. In: \_\_\_\_\_, **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden. p. 341-359, 1989.

LOHDEFINK, J.; KARTING, H. Zur Frage des Vorkommens von Harmanalkaloiden in *Passiflora*-Arten. **Planta Medica**, v. 25, n. 1, p. 101-104, 1974 apud REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvética**, v. 69, p. 153-158, 1994.

LUTOMSKI, J.; SEGIET, E.; SZPUNAR, K.; GRISSE, K. Die Bedeutung der Passionsblume in der Heilkunde. **Pharmazie in unserer Zeit**, v. 10, p. 45-49, 1981 apud **ESCOP**. *Passiflorae herba: Monographs on the medicinal uses of plant drugs*, Fascicule 4. Exeter, UK, p. 1-5, 1997.

MARQUES, L.C. **Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: uma abordagem da vigilância sanitária.** 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; DIAS, M. I.; BERNARDO, F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 149-153, 2001.

MEMORY, L. -E., Should we be concerned about herbal remedies. **J. Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

MENEZES, M. G. O; CARLINI, E. A. Efeitos farmacológicos da administração aguda da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. A. (Coord.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia) “espinheira-santa” e outras**. Brasília:CEME/AFIP, p. 37-48, 1988;

MENSSEN, H. G. Standardisierung und Zubereitungsformen von Phytopharmaka. **Pharmazeutische Zeitung**, v. 124, n. 6, p. 223-226. 1979.

MESQUITA, A. L.; CORREA, D. B.; PADUA, A. P.; GUEDES, M. L. O.; GOTTLIEB, O. R. Flavonoids from four Compositae species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1255-1256, 1986.

MILLS, J.; BONE, K. **Principles and Practice of Phytotherapy**: modern herbal medicine. Edinburgh:Churchill Livingstone, 2000. p. 378-384.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brasil**. Algonac: Reference Publications, 2000, p. 267-271.

MUSCI, I. Combined antiviral effects os flavonoids and 5-ethyl-2'-deoxyridine on the multiplication of herpesviruses. **Acta virologica**, v. 28, p. 395-400, 1984.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Herbal medicines**: a guide for health-care professionals. London: The Pharmaceutical Press,1996.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2004.

OGA, S.; FREITAS, P. C. D.; SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 51, p. 303-306, 1984.

OHSAKI, A.; IMAI, Y.; NARUS, M.; AYABE, S.; KOMIYAMA, K.; TAKASHIMA, J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 469-471, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991.

PACHALY, P. **DC-Atlas**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1999.

- PEIRCE, A. **Practical Guide to Natural Medicines**. New York: Stonesong, 1999.
- PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes do Gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
- PETRY, R.; REGITTANO, F.; De-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Comparative pharmacological study of hidroethanolic extracts of *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Resarch**, v. 15, p. 162-164, 2001.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978. v. 5, p. 21.
- PUHLMANN, J.; KNAUS, U.; TUBARO, L.; SCHAEFER, W.; WAGNER, H. Immunologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2617-2621, 1992.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 12, p. 32-36, 2001.
- ROGERS, C. B.; ABBOUTT, A. T. D.; WYK, A. E. A convenient thin layer chromatographic technique for chemotaxonomic application in *Maytenus* (Celastraceae). **South African Journal of Botany**, v. 66, n. 1, p. 10-14, 2000.
- ROMBI, M. **100 Plantes Medicinales** Composition: mode d'action et interet therapeutique. Paris: Romart, 1991.
- SAMUELSSON, G. **Drug of natural origin: a textbook of pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 1992.
- SANTOS A.L.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, V. L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. aqueous extracts. **Phytotherapy Research**, vol. 13, n.1, p. 65-66, 1999. Abstract. Medline/Pubmed
- SCHENKEL, E. P.; RECH, N.; FARIAS, M. R.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Assistência Farmacêutica. In: GUIMARÃES, R. (Org.). **Saúde no Brasil: contribuição para a agenda de prioridades de pesquisa**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O.; MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 65-72, 1985.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.).

**Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC. 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, 2004. **Saponinas**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2004.

SCHILCHER, H.; PETERS, H.; WANK, H. Pestizide und Schwermetalle in Arzneiplanzen and Arzneiplanzen Zubereitungen. **Pharm. Ind.**, v. 49, p. 202-211, 1987 apud ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER, M. S.; TANTAWY, EI.; BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, p. 357-363, 1999.

SCHMIDT, P. C.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von Passiflorae herba. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, n. 47, p. 17-26, 1993.

SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1985. v.2.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Revised structures of sangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 11-115, 1997.

SILVA, C.G; RECIO, R.A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; PAIVA, R.L.R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (espíneira-santa). **Tribuna Farmacêutica**, v. 57/59, n. 1-2-3, p. 46-50, 1991.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica da Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 1984. 186 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Análise, Síntese e Controle de Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMÕES, C. M. O.; FARIAS, M. R.; BONFANTE, C.; SOUZA, M. M.; ROVARIS, D. A. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos no Brasil. In: **II Congresso de la Federación Farmacéutica Sudamericana**. 1995, Santiago, Chile. Resumo.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5 ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais. **Nexus: Ciências e Tecnologia**, ano 1. n. 1. p. 24-27, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2004.

SONAGLIO, D. **Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC.** 1987. 163p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Análise, Síntese e Controle de Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

SOUZA, M. P.; MATOS, N. E. O.; MATOS, M. F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileira**: Fortaleza: EUFC, p. 304, 1991.

**THE JAPANESE PHARMACOPOEIA XIV**. 2001. English version. Disponível em: <<http://jpdn.nihs.go.jp/jp14e/>>. Acesso em fev. 2004.

TONG, S.; CHIRNDING, Y.E.; PRAPAMONTOL, T. **Environmental lead exposure: a public problem of global dimension**. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p.1068-1077, 2000.

TÜNZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, p. 1-9, 2003.

TYLER, V. E. **The Honest Herbal: A sensible guide to the use of herbs and related remedies**. 3. ed. New York: Pharmaceutical Products Press, 1993.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 783, 1982.

THE UNITED States Pharmacopoeia, 26 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Easton: Mack. 2003. CD-ROM.

VALE, N. B.; LEITE, J. R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 11-24, 1983.

VIDAL-OLLIVIER, E.; BALANSARD, G. Revised structures of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 5, p. 1156-1159, 1989.

VILEGAS, J.H.Y.; CAPPELARO, E.A.; TIBERTI, L. A. ; VASCONCELOS, E.C.; LANÇAS, F.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C. Characterization of adulteration of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by high performance thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 263-266, 1998.

VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. High resolution gas chromatography analysis of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 241-244, 1994.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462p.

WAGNER, H.; PROKSCH, A.; RIESS-MAURER, I.; VOLLMAR, A.; ODENTAHL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; TURDU, M. L.; FANG, J. N. Immunstimulierend polysaccharide (Heteroglycane) aus höheren Pflanzen. **Arzneim. Forsch.**, v. 35, n. 2, p. 1069-1075, 1985 apud BETTEGA, J. M. P. R. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Astereceae – marcela**. 2000. 99 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996.

**WORLD** Health Organization. Elemental Mercury and Inorganic Mercury compounds: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment document 50. Geneva: WHO, 2003.

**WORLD** Health Organization. Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products Supplementary Guidelines for the Manufacture of Herbal Medicinal Products. Geneva: WHO, 1993. 5p.

**WORLD** Health Organization. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. Geneva: WHO, 1991. 4p.

**WORLD** Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva: WHO, 1998.

YOSHIKAWA, M.; MURAKANI, T.; KISHI, A.; KAGEURA, T.; MATSUDA, H. Medicinal flowers. III. Marigold. (1):Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C and D. from Egyptian *Calendula officinalis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 863-870, 2001.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W. S. M.; FÁVERO, M. L. D.; CORREA JUNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p.29-39, 2004.

ZHANG, X. (Coord). ***Calendula officinalis***: Monographs on selected medicinal plants. Ravello-Salerno: WHO, v. 2, 1999.



ZHANG, X. **Regulatory situation of herbal medicines:** a worldwide review. Geneva: WHO, 1998.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 265-268, 1997.