UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Controle de qualidade do extrato fluido e tintura de
guaco (*Mikania glomerata* Sprengel)**

Adriana de Carvalho Osorio

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Luiz Seferin Martins

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O83c Osorio, Adriana de Carvalho
Controle de qualidade do extrato fluido e tintura de guaco
(*Mikania glomerata* Sprengel) / Adriana de Carvalho Osorio.
-- São Paulo, 2002.
121p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Martins, Jorge Luiz Seferin

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Produtos naturais :
Controle de qualidade : Farmacognosia I. T. II. Martins, Jorge
Luiz Seferin , orientador.

615.19015 CDD

Adriana de Carvalho Osorio

Controle de qualidade de extrato fluido e tintura de guaco (*Mikania glomerata*
Sprengel)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jorge Luiz Seferin Martins
orientador/presidente

Prof.^a Dr.^a Mayume Eliza Otsuka Sato
1º. examinador

Prof.^a Dr.^a Magali Bejamim de Araujo
2º. examinador

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos
3º. examinador

Prof.^a Dr.^a Vladi Olga Consiglieri
4º. examinador

São Paulo, 22 de abril de 2002

Aos meus pais
Ubirajara e Therezinha
de Carvalho Osorio
pelo carinho e incentivo.

Ao professor

*Dr. Jorge Luiz Seferin Martins ,
agradeço pela orientação e
dedicação.*

Agradecimentos

- À FAPESP pelo apoio financeiro.
- Ao Dr. Ilio Montanari, do CPBQA-Unicamp pelo fornecimento do material botânico.
- Aos técnicos Regina Maura Rojas, Iria R. da Silva e Roberto de Jesus Honório, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP , pela colaboração na elaboração da parte pratica deste trabalho.
- As professoras que participaram da banca do exame de qualificação, Dra. Dominique Corine H. Fischer , Dra. Vladi Olga Consiglieri e Dra. Magali Bejamim de Araujo, pelo empenho na correção e sugestões.
- À Cristiana C. O. Calicchio pela dedicação na revisão de linguagem deste trabalho.
- À bibliotecaria Leila Aparecida Bonádio pela orientação na parte de referências bibliográficas.
- Aos colegas de pos-graduação pelo convívio e amizade: Moacir, Clarisse, Beatriz, Aldo, Fatima, Elizangela, Maria Aurora, Anil, Martin, Andrea P., Andrea M., Gabriela, Ixis, Nadjla, Daniela, Maia, Elizabete, Tatiana e Elton.
- A minha família pelo constante apoio e carinho.

CONTEÚDO

RESUMO	i
ABSTRAT	ii
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVO	4
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Monografia do guaco	5
3.1.1. Sinonímia científica	5
3.1.2. Sinonímia popular	5
3.1.3. Identificação da droga vegetal	6
3.1.3.1.Descrição da droga segundo a Farmacopéia Brasileira 1ª ed.	6
3.1.3.2. Características importantes na morfodiagnose do guaco	7
3.1.4. Dados de coleta e pureza da droga	9
3.1.5. Composição química	9
3.1.6. Ensaio químicos	12
3.1.7. Uso popular da planta	13
3.1.8. Dados farmacológicos	13
3.1.9. Formas farmacêuticas	16
3.1.10. Posologia	18
3.2. Cumarina	19
3.2.1. Propriedades físico-químicas da cumarina	19
3.2.2. Usos da cumarina	20
3.2.3. Toxicidade da cumarina	20
3.2.4. Ocorrência da cumarina	21
3.2.5. Métodos de identificação e doseamento da cumarina em material de origem vegetal	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material	28
4.1.1. Material botânico	28

4.1.2.	Extrato fluído de guaco padrão	28
4.1.3.	Tintura de guaco padrão	28
4.1.4.	Xarope de guaco padrão	29
4.1.5.	Amostras adquiridas do comércio	29
4.1.6.	Equipamentos	30
4.2.	Métodos	31
4.2.1.	Validação do método oficial de doseamento de cumarina por espectrofotometria no visível após reação de diazotação da A.O.A.C. 10 ^a ed. no extrato fluido e tintura de guaco	31
4.2.1.1.	Preparação de reagentes	31
4.2.1.2.	Construção da curva de calibração da solução do padrão de cumarina	32
4.2.1.3.	Aplicação do método ao extrato fluido e tintura de guaco padrões	33
4.2.1.4.	Teste de recuperação o método da A.O.A.C. 10 ^a ed..	33
4.2.2.	Padronização do método de doseamento de cumarina por espectrofotometria derivada para extrato fluido e tintura de guaco.	34
4.2.2.1.	Reagentes utilizados	34
4.2.2.2.	Varredura espectral da solução do padrão de cumarina	35
4.2.2.3.	Varredura espectral do extrato fluido de guaco padrão	35
4.2.2.4.	Varredura espectral da tintura de guaco padrão	36
4.2.2.5.	Pesquisa da interferência do solvente utilizado na preparação do extrato fluido e tintura de guaco	36
4.2.2.6.	Construção da curva de calibração da solução do padrão de cumarina	36
4.2.2.7.	Aplicação do método para extrato fluido e tintura de guaco padrões	36
4.2.2.8.	Teste de recuperação do método de espectrofotometria derivada para extrato fluido de guaco padrão	37
4.2.2.9.	Teste de linearidade do método de espectrofotometria derivada para extrato fluido de guaco padrão	38
4.2.3.	Estudo para determinação de taninos em extrato fluido e tintura de guaco de acordo com Farmacopéia Européia 2 ^a ed. e Farmacopéia Brasileira 4 ^a ed.	38
4.2.3.1.	Reagentes utilizados	38
4.2.3.2.	Determinação do padrão de pirogalol	39
4.2.3.3.	Doseamento de taninos no extrato fluido e tintura de guaco padrões	39

4.2.4. Avaliação das amostras de extrato fluido e tintura de guaco encontradas no mercado	40
4.2.4.1. pH	40
4.2.4.2. Densidade	40
4.2.4.3. Teor de resíduo seco	40
4.2.4.4. Determinação do teor de cumarina	41
4.2.4.4.1. Reagentes utilizados	41
4.2.4.4.2. Determinação do padrão de cumarina	41
4.2.4.4.3. Doseamento das amostras comerciais	42
4.2.4.5. Determinação do teor de taninos	42
4.2.4.5.1. Reagentes utilizados	42
4.2.4.5.2. Determinação do padrão de pirogólol	43
4.2.4.5.3. Doseamento das amostras comerciais	43
4.2.4.6. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada	44
4.2.5. Estudo de estabilidade do extrato fluido e tintura do guaco	45
4.2.5.1. pH	45
4.2.5.2. Resíduo seco	45
4.2.5.3. Teor de cumarina	45
4.2.5.3.1. Reagentes utilizados	45
4.2.5.3.2. Determinação do padrão de cumarina	46
4.2.5.3.3. Doseamento das amostras	46
4.2.5.4. Análise qualitativa do extrato fluido e tintura por cromatografia em camada delgada	46
4.2.6. Comparação dos métodos de preparação de extrato fluido de guaco.	46
4.2.6.1. pH	47
4.2.6.2. Resíduo seco	47
4.2.6.3. Teor de cumarina	47
4.2.6.4. Teor de taninos	47
4.2.7. Estudo da aplicação do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem em xarope de guaco	47
4.2.7.1. Reagentes utilizados	47
4.2.7.2. Varredura espectral da solução de xarope de guaco	48
4.2.7.3. Pesquisa de interferentes	48
4.2.7.4. Determinação do padrão de cumarina	48
4.2.7.5. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco	49
4.2.7.6. Teste de recuperação do método de espectrofotometria derivada para xarope de guaco	49
4.2.7.7. Teste de linearidade do método de espectrofotometria derivada para xarope de guaco	50
4.2.7.8. Determinação do teor de cumarina na amostra	

comercial de xarope de guaco	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Valores obtidos do estudo de doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação pela A.O.A.C. 10ª ed. em extrato fluido e tintura de guaco	51
5.1.1. Construção da curva de calibração do padrão de cumarina	51
5.1.2. Determinação de cumarina nos extrato fluido e tintura de guaco padrões por espectrofotometria visível após reação de diazotação da A.O.A.C. 10ª ed.	53
5.1.3. Resultados estatísticos do estudo do doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação da A.O.A.C. 10ª ed.	54
5.1.4. Valores obtidos no teste de recuperação do estudo do doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação da A.O.A.C. 10ª ed.	55
5.2. Valores obtidos da padronização do método de doseamento da cumarina por espectrofotometria por derivada de primeira ordem em extrato fluido e tintura de guaco	56
5.2.1. Varreduras espectrais obtidas	56
5.2.2. Varreduras espectrais obtidas da pesquisa da interferência do solvente utilizado para preparação de extrato fluido e tintura de guaco	57
5.2.3. Determinação da curva de calibração da solução do padrão de cumarina pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem	58
5.2.4. Valores obtidos da determinação do teor de cumarina pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem no extrato fluido e tintura de guaco padrão	60
5.2.5. Resultados estatísticos do método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para dosagem de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco padrões	62
5.2.6. Valores obtidos no teste de recuperação do método da espectrofotometria derivada de primeira ordem para extrato fluido de guaco padrão	63
5.2.7. Valores obtidos no teste de linearidade do método da espectrofotometria derivada de primeira ordem para extrato fluido de guaco padrão	64

5.3. Estudo para determinação de taninos em extrato fluido e tintura de guaco padrões de acordo com Farmacopéia Européia 2ª ed. e Farmacopéia Brasileira 4ª ed.	66
5.4 Avaliação das amostras de extrato fluido e tintura encontradas no mercado	68
5.4.1. Avaliação da apresentação do produto	68
5.4.2 pH	70
5.4.3. Densidade	71
5.4.4. Determinação do teor de resíduo seco	72
5.4.5. Determinação do teor de cumarina	74
5.4.6. Determinação do teor de taninos	77
5.4.7. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada das amostras de extrato fluido e tintura	80
5.5. Valores obtidos no estudo de estabilidade do extrato fluido e tintura de guaco padrões	85
5.5.1. Determinação do pH das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura	85
5.5.2. Determinação de resíduo seco das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura	87
5.5.3. Valores do teor de cumarina das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura	89
5.5.4. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura	92
5.6. Comparação dos métodos de preparação de extrato fluido	94
5.7. Valores obtidos no estudo da aplicação do método de determinação da cumarina por espectrofotometria derivada na primeira ordem para xarope de guaco	95
5.7.1. Varredura espectral da solução de xarope de guaco na derivada de primeira ordem	95
5.7.2. Pesquisa de interferentes	95
5.7.3. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco	96
5.7.4. Resultados estatísticos do método por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco	97
5.7.5. Valores obtidos do teste de recuperação do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco	98
5.7.6. Valores obtidos do teste de linearidade do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco	99
5.7.7. Valores obtidos na determinação do teor de	

	cumarina em amostra comercial de xarope de guaco	100
6.	DISCUSSÃO	101
7.	CONCLUSÕES	111
8.	ANEXO I	112
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

RESUMO

O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) é uma planta medicinal brasileira empregada em medicamentos para tosse e problemas respiratórios. Devido ao interesse que esta espécie desperta e a popularidade de sua utilização estão sendo realizados estudos fitoquímicos e farmacológicos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia para o controle de qualidade do extrato fluido e tintura desta planta, a partir da escolha de uma substância marcadora – a cumarina (1,2-benzopirano), e pesquisar um método de doseamento preciso, exato e de fácil execução.

Primeiramente, testou-se o método da A.O.A.C. 10^a ed. (Association of Official Agricultural Chemists), um método oficial para doseamento de cumarina em extrato de vanilina, cujo resultado não foi considerado reprodutível para extrato fluído e tintura de guaco por apresentar coeficiente de variação e desvio padrão muito altos.

Em seguida, desenvolveu-se um método por espectrofotometria derivada de primeira ordem, obtendo-se um resultado preciso, exato, linear e reprodutível, cujo desvio padrão foi menor que 1%, o teste de recuperação ficou em torno de 102% e coeficiente de linearidade da reta de calibração foi de 0,9951.

O método de espectrofotometria derivada foi utilizado na análise das amostras adquiridas no comércio, analisando-se em paralelo o teor de taninos, teor resíduo seco, densidade e análise cromatográfica em camada delgada.

Através do estudo de estabilidade, conclui-se que a validade mínima do extrato fluido e tintura de guaco é de 2 anos.

SUMMARY

The guaco (*Mikanina glomerata* Sprengel) is a Brazilian medicinal plant used in medicines for cough and breathing problems. Because of the interest that these species arouse and the popularity of their use, phytochemical and pharmacological studies are being realized.

The objective of this work was to develop a methodology for the quality control of "guaco" fluid extract and tincture, separating the marked substance – the coumarin (1,2 – benzopyran), and to research an accurate and exact method that it was easy to execution.

First, it was tested the A.O.A.C. (Association of Official Agriculture Chemists) method 10^a ed., an official method for coumarin dosage in vanillin extract, which the result wasn't considered reproducible for "guaco" fluid extract and tincture because it shows a coefficient of variation and standard deviation very high.

Then, a method by first-derivative spectrophotometry was developed and it was achieved an accurate, exact and reproducible result, which the standard deviation was less than 1%, the recovery test was around 102% and the linearity coefficient of calibration curve was 0,9951.

The derivative spectrophotometric was used to analyse samples acquired in the market and in parallel, tannins content, dry residue content, density and thin layer chromatography analyse.

According to stability studies, it was concluded that the minimum expiry date of "guaco" fluid extract and tincture is 2 years.

I - INTRODUÇÃO

A utilização de ervas medicinais na cura e amenização de enfermidades é tão antiga que incorpora-se a própria história da humanidade. Na antigüidade já existiam tratados referentes ao uso de plantas medicinais e, até o começo do século XX, a única fonte de medicamento era de origem natural.

Os primeiros medicamentos sintetizados e princípios ativos isolados de plantas surgiram no início do século passado. Acreditava-se que as drogas sintéticas ocupariam totalmente o lugar dos medicamentos naturais, porém, a insatisfação com as limitações e o custo da medicina moderna fez ressurgir o interesse pela medicina natural.

Com todas as mudanças ocorridas no último século - a industrialização, a preocupação com a qualidade de vida - houve a necessidade de maiores cuidados com a demanda do consumo de fitoterápicos.

Vários países estão regulamentando a utilização de fitoterápicos e, com o objetivo de implantar parâmetros de qualidade, eficácia e segurança no emprego de plantas medicinais, a Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) publicou o Guia de Boas Práticas para Fabricação de Fitoterápicos, Métodos de Controle de Qualidade para Plantas Medicinais e Monografias da OMS de Plantas Medicinais^{91, 92, 93}.

No Brasil foi publicada a portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995 e, posteriormente, revogada pela resolução nº17 de 24 de fevereiro de 2000. Estas leis visam normatizar o registro de medicamento fitoterápico junto ao sistema de Vigilância Sanitária^{9, 10, 46}.

Resumindo os itens exigidos pela nova legislação, podemos destacar os seguintes requisitos básicos para registro de fitoterápicos ¹⁰:

Para matéria-prima de origem vegetal:

- nomenclatura botânica oficial.
- nomenclatura farmacopeica e/ou tradicional.
- laudo de identificação botânica e/ou especificação farmacognóstica.
- teste de autenticidade (características organolépticas, macroscópicas e microscópicas).
- teste de pureza e integridade, de acordo com critérios farmacopeicos ou com as recomendações da O.M.S.
- análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e ou marcadores, quando conhecidos.

Quanto aos derivados de matéria-prima vegetal (extratos, tinturas, óleos, ceras, etc.), deve-se especificar a procedência e caracterizá-los, atendendo aos itens acima.

Quanto ao medicamento acabado, é necessário constar:

- concentração real em peso ou volume da matéria-prima vegetal e a correspondência em princípio ativo, quando conhecida.
- fórmula completa de preparação.
- descrição dos critérios de identificação do lote ou partida.
- relatório descritivo da fabricação e controle de qualidade, especificando-se as operações realizadas e identificando-se os pontos de controle de processos e métodos utilizados.
- teste de estabilidade do medicamento acabado, em seu material de acondicionamento original.
- descrição das práticas de transporte e de armazenamento do medicamento.
- estudos científicos que comprovem a segurança do uso do medicamento, de acordo com exigências do Conselho Nacional de

Saúde CNS (Resolução 196/96): toxicologia pré-clínica e clínica; estudo científico que comprove a eficácia, segurança, farmacologia pré-clínica e clínica, apresentação das contra-indicações, restrição de uso, efeitos colaterais e reações adversas para cada forma farmacêutica.

Em função das características exigidas pela nova legislação, o Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos do Estado de São Paulo elaborou uma lista com 102 espécies vegetais prioritárias para elaboração de monografias, encontradas no mercado de fitoterápicos em geral. O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) está citado entre essas plantas⁵³.

O guaco é uma espécie nativa da flora brasileira e consta da Farmacopéia Brasileira 1ª ed. Encontra-se comercializado e industrializado principalmente na forma de tintura e extrato fluido, incorporado à xaropes para tosse em associações com outras plantas como agrião, ipeca, poligala, acônito e outras.^{24, 80, 94}

II - OBJETIVO

Desenvolver metodologia para o controle de qualidade de extrato fluido e tintura de guaco, e avaliar os produtos existentes no mercado, tendo como etapas:

- 2.1. Preparar a tintura e o extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel, a fim de obter um padrão que será utilizado nas determinações quantitativas e no estudo da estabilidade.
- 2.2. Desenvolver um método preciso e de fácil execução para determinação quantitativa da cumarina (1,2-benzopirano), no extrato fluido e tintura de guaco.
- 2.3. Analisar as amostras de tintura e do extrato fluido de guaco, adquiridos no comércio.
- 2.4. Realizar estudo de estabilidade da tintura e do extrato fluido de guaco.
- 2.5. Testar o método desenvolvido em xarope de guaco.

III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MONOGRAFIA DO GUACO (*Mikania glomerata* Sprengel).

A droga guaco é constituída por folhas e partes aéreas de *Mikania glomerata* Sprengel. É uma espécie vegetal pertencente à família *Asteraceae*, nativa da flora brasileira, de ocorrência espontânea nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo. A Farmacopéia Brasileira 1ª edição descreve *Mikania glomerata* Sprengel como a espécie oficial, embora existam outras espécies conhecidas pelo nome de guaco, entre as quais podemos citar: *Mikania congesta* DC, *Mikania smilacina* DC, *Mikania microlepis* Baker, *Mikania hookeriana* DC, *Mikania confertifissima* Schultz, *Mikania hatschbacchii* Barroso e *Mikania laevigata* Schultz.^{7, 20,44, 60, 67, 80}

3.1.1. Sinônima científica⁷³.

Cacalis trilobata Vell

Mikania hederaefolia DC

3.1.2. Sinônima popular^{7, 61}.

Cacalia,

Cipó-caatinga,

Coração-de-jesus,

Ervas-das-serpentes,

Guaco-da-caatinga,
Guaco-de-cheiro,
Guaco-trepador,
Uaco,
Huaco.

3.1.3. Identificação da droga vegetal.

3.1.3.1. Descrição da droga Guaco segundo a Farmacopéia Brasileira 1ª edição ⁸⁰.

Descrição macroscópica - A folha de guaco é peciolada, oval-lanceolada, acuminada no ápice e de base arredondada ou subcordada. Mede de 10 a 15 cm de comprimento, por até 5 cm de largura. As margens são inteiras e levemente sinuosas. O limbo é glabro e lúcido sobre ambas as páginas, sensivelmente lobado; contém de 3 a 5 nervuras básicas, oriundas do ápice do pecíolo, que mede de 3 a 6 cm de comprimento. Possui odor característico e sabor aromático amargo.

Descrição microscópica - A epiderme glabra é formada, na página superior, de células poligonais de paredes levemente curvas e na inferior de células de paredes ondeadas. Os estômatos são do tipo anomocítico e providos de três a quatro células paraestomatais e ocorrem exclusivamente na epiderme inferior. Ambas as epidermes contêm pêlos glandulares uniseriados, pluricelulares, do tipo geral das Compostas, mais freqüentes sobre a página inferior e situado nas depressões epidérmicas. O mesófilo é heterogêneo, assimétrico, formado na parte superior por uma ou duas

camadas de células paliçadas e, na inferior, por parênquima lacunoso, formado de células arredondadas ou elípticas. A nervura mediana, fortemente biconvexa, apresenta de três a cinco feixes libero lenhosos ovais, dispostos em arco e formados por um cordão lenhoso recoberto inferiormente por floema e, em ambas as extremidades, por bainhas fibrosas lignificadas. Nas proximidades desses feixes notam-se pequenos canais secretores.

3.1.3.2.Características importantes na morfodiagnose do guaco.

A Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil 1ªed. oficializou as folhas de *Mikania glomerata* Sprengel como a droga guaco. Entretanto, a droga comercializada é constituída pelas partes aéreas do vegetal, acompanhadas ou não de órgãos reprodutivos⁶⁶.

Segundo Oliveira e col., podemos ressaltar como características importantes para facilitar sua identificação ^{61, 65, 66}:

Características macroscópicas: fragmentos de caules estriados longitudinalmente, providos de nó bem evidente de onde partem folhas trilobadas opostas; pedaços de caules mais calibrosos observando-se externamente a presença de lenticelas verrucosas. Flores, quando presentes em capítulos reunidos em glomérulos; floretas providas de papus de coloração variando entre amarela palha à rosada.

Características microscópicas: secção da nervura mediana da folha aproximadamente plano-convexa;

presença de camada celular aclorofilada subepidérmica na folha; colênquima do tipo angular, parênquima paliçádico presente na região da nervura mediana da folha; epidermes quase glabras providas de estômatos anomocíticos e de pêlos glandulares unisseriados curvos localizados em depressões epidérmicas, presença de canais secretores nas folhas e nas inflorescências.

Outras espécies de mikánias se confundem com a *Mikania glomerata* Sprengel, entre elas podemos citar a *Mikania biformis* DC, *Mikania diversifolia* DC, *Mikania triangulares* Baker e *Mikania cordifolia* Willdenow⁶⁰.

A espécie vegetal que aparece com maior frequência em substituição ao guaco verdadeiro, em São Paulo, é a *Mikania leavigata* Schultz. A semelhança morfológica entre as 2 espécies, bem como, o cheiro cumarínico comum a ambas, constituem fatores importantes na substituição das espécies, porém, o que diferencia *Mikania leavigata* Schultz é a folha de consistência coriácea, biconvexa e a ausência de foleira celular em paliçada na região da nervura mediana das folha^{63, 64}.

Outra diferenciação citada é que *Mikania glomerata* Sprengel possui folhas ovadas a deltoídes, pronunciadamente lobada, base cordada, às vezes truncada e a *Mikania leavigata* Schultz possui folhas lanceolodas e estreitamente ovadas, às vezes lobadas e base obtusa⁵².

Oliveira, analisando comparativamente extratos fluidos elaborados com estas 2 espécies, concluiu que apresentam composição semelhante e que,

provavelmente, se possa empregar *Mikania leavigata* Schultz como sucedâneo de *Mikania glomerata* Sprengel^{63,64}.

3.1.4. Dados de coleta e pureza da droga.

O padrão de aceitação do produto no comércio recomenda folhas com ramos finos e inflorescência. O peso dos ramos não deve exceder o das folhas. As folhas não devem apresentar manchas. A droga não deve conter matéria orgânica estranha (insetos, outras plantas, etc.)⁵¹.

Estudos mostraram, que a época do ano que a *Mikania glomerata* Sprengel apresenta maior concentração de cumarina é entre os meses de janeiro e fevereiro¹³.

3.1.5. Composição Química.

Quanto às substâncias químicas isoladas temos:

Cumarina

A cumarina (1,2-benzopirano) é o composto que se encontra em maior quantidade sendo sugerida como substância marcadora^{67, 78, 89}.

Ácido caurenóico $R'=R''=H$

Ácido cinamolgrandiflórico

$R'=H$

$R''=$

Ester metil ácido caurenóico: $R'=Me, R''=H$ ^{67,89}

Ácido Entbeyer15(16)en-oico ⁸⁷

Estigmaster-22-en-3-ol ⁶⁷ (3-hidroxi 2,4-etil Δ^{55} colestadieno)

Friedelina ⁸⁷ (Firedalano-3-ona)

Lupeol ⁸⁹ (Lup-20-(30)-en-3-β-ol)

Foi constatada também a presença de resina, saponina, óleo essencial, taninos (pirocátéquicos) e outros compostos fenólicos ⁶².

O óleo essencial é muito complexo, sendo composto por monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (hidrocarbonetos e oxigenados). Entre os compostos temos: sabineno, β-pineno, silvastrino e mentol ¹⁴.

3.1.6. Ensaios físico-químicos.

Oliveira e col. ⁶⁹ utilizaram cromatografia em camada delgada para identificação do guaco. Os perfis cromatográficos desenvolvidos utilizaram padrões de ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflórico, estigmasterol e cumarina com fase estacionária silicagel G60 e fases móveis benzeno:acetato de etila (19:1) e heptano:acetona (10:3). O revelador foi solução de hidróxido de sódio 5%, com visualização à luz UV 365nm quando comparado com padrão de cumarina. Para os demais

padrões foi utilizado o revelador sulfovanílico, com visualização à luz normal.

Nakashima e Krespy ⁵⁷ determinaram o perfil cromatográfico em camada delgada utilizando fase móvel n-hexano:acetato de etila (85:15). Os reveladores considerados mais adequados foram KOH 10% com o padrão de cumarina e vanilina sulfúrica com padrão estigmasterol .

3.1.7. Uso popular da planta.

Esta droga tem uso muito difundido, já era usada pelos índios para picada de cobra e aparece escrita em formulários desde o início do século XX, como o Chernovix Formulário, F.H. Hoehne, Catálogo Granado, Farmacopéia Brasileira 1ªed. e outros. Ainda hoje é citada em levantamentos etnofarmacobotânicos pela população como planta de uso na medicina caseira ^{23, 44, 81,} .

As indicações populares mais conhecidas são: anti-séptico das vias pulmonares, problemas pulmonares, tônico amargo, cicatrizante de feridas, prurido e eczema. Também são atribuídas as atividades: antiinflamatória, antiespasmódica, béquicas, anti-gripal e anti-reumática^{18, 48,71,84} .

3.1.8. Dados farmacológicos.

Das atividades farmacológicas atribuídas ao guaco, Oliveira e col. ⁶⁸ constataram a ação antiinflamatória do extrato fluido através do teste da atividade antiedema em pata do rato, induzida por carragenina e quantificada por pletismografia; onde os resultados obtidos para a dose de 5mL/kg por peso

do rato, apresentaram um aumento do volume percentual da pata de 75,4%, após 300min. e de 81,6% comparando com o grupo controle. Essas inibições foram ligeiramente menores do que a produzida por fenilbutazona.

Leite e col.⁴² estudaram de modo comparativo os efeitos do extrato hidroalcoólico da *Mikania glomerata* Sprengel em relação aos produzidos pela cumarina encontrada na planta, submetendo a ensaios "in vivo" (edema de pata induzido pela carragenina em rato) e "in vitro" (preparações de jejuno de rato, íleo de cobaia e traquéia de rato utilizando acetilcolina e histamina como agonistas). Os resultados mostraram efeitos espasmolítico, antiinflamatório e broncodilatador, do extrato e também da solução de cumarina. A diferença ao que se refere a intensidade dos efeitos farmacológicos observados indicam que há outros compostos biologicamente ativos presentes no extrato, além da cumarina.

Experimentos farmacológicos efetuados por Moura e col.⁵⁵ também colocou em evidência a ação dilatadora de traquéia de cobaias pelo extrato fluido.

Pereira e col.⁷² testaram a atividade antiofídica da cumarina extraída da *Mikania glomerata* Sprengel frente ao veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*); a sobrevivência dos animais foi medida de 6, 24 e 48 horas e registrada em porcentagem de animais vivos. A cumarina apresentou taxas de sobrevivência de 80%, 50% e 40%, respectivamente aos intervalos de 6, 24 e 48 horas, enquanto, o grupo controle apresentou para os mesmos intervalos taxas de 30%, 0% e 0%.

Ruppelt e col.⁷⁶ estudaram a atividade analgésica e antiinflamatória do chá de guaco, usando os respectivos ensaios de número de contorções em camundongos e difusão do corante azul de Evans no peritônio, segundo a técnica de Whittle modificada por Fernandes. O grupo de camundongos que ingeriram o chá de guaco apresentou inibição de contrações de 63,1% e difusão do corante de 48,92%, em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que o guaco demonstra atividade analgésica e atividade antiinflamatória em menor intensidade.

Fierro e col.³¹ avaliaram a fração obtida do extrato etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel (MG1) para as propriedades antialérgica e antiinflamatória. Estas propriedades foram avaliadas em pleurite alérgica induzida por ovoalbumina e em modelos de inflamação local induzida por aminas biogênicas, carrageninas e PAF (fator de agregação plaquetária). A exudação do plasma como a infiltração neutrófila e eosinófila provocada por injeção intrapleural do antígeno foi significativamente reduzida pela fração MG3. Igualmente a migração neutrófila pleural induzida por PAF foi inibida pelo tratamento com MG3. Por outro lado, o pré-tratamento de animais com MG1 fracassou para modificação da pleurite induzida pela histamina, serotonina ou carragenina. Esses resultados sugerem que MG1 é efetivo na inibição na inflamação imunológica, mas não é eficaz na resposta inflamatória aguda causada por outros agentes.

Bighetti e col.⁸ estudaram a atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. Esta atividade foi avaliada em cultura de células

tumorais humanas, mama resistente, pulmão e melanoma. Este estudo concluiu que o extrato bruto apresentou atividade antiproliferativa para todas as linhagens estudadas.

Foi detectada também atividade antimicrobiana dos extratos clorofórmicos frente à *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁸.

Ensaio de toxicidade aguda feito por Oliveira e col.⁶⁸ mostraram que o extrato fluido em dose única de 5 a 10mL/Kg, por via oral, não causou mortalidade em ratos. Na dose de 40mL/Kg, via oral, produziu efeito letal em 40% dos animais no período de 24 horas, esses resultados indicam baixa toxicidade do extrato de guaco.

Contra-indicações e usos durante gestação e lactação não foram encontrados na literatura. Efeitos colaterais em doses terapêuticas não foram relatados, mas em alta dosagem pode causar vômitos e diarreia. Seu uso prolongado pode causar acidentes hemorrágicos^{71, 84}.

3.1.9. Formas farmacêuticas.

As preparações galênicas desta planta encontram-se descritas na Farmacopéia Brasileira 1ª ed.⁸⁰, temos: alcoolatura, tintura, extrato fluido, pó e xarope.

Extrato fluido: guaco, folha pulverizada.....1Kg
álcool e água qsp..... 1L

A preparação emprega o processo A da Farmacopéia 1ª ed., utilizando-se como líquido extrator 2 partes de água e uma parte de álcool; o trabalho de Virgílio Lucas⁴⁴ ressalta a

importância de se inverter a proporção do líquido extrator para 2 partes de álcool e 1 parte de água. As características organolépticas gerais do extrato são: líquido de cor pardo escuro, de odor e sabor aromático, um pouco amargo, agradável. Densidade - 1,005. Resíduo seco a 100°C - 20,4%.

Tintura: guaco, folha pulverizada... 200g
 álcool e água qsp 1L

A tintura deve ser preparada pelo processo P da Farmacopéia Brasileira 1ª ed., usando como líquido extrator 2 partes de álcool para uma parte de água. O produto deve apresentar as seguintes características gerais: Cor - parda esverdeada, odor - aromático próprio, sabor - ardente aromático próprio, aspecto - límpido, turvação com mistura em água, densidade 0,860, resíduo seco a 100°C - 2,4%^{44, 80}.

Alcoolatura: folhas frescas picadas 500g.
 álcool..... 1000mL

Maceração durante 15 dias e filtração por papel.

O produto deve apresentar características de um líquido de cor verde e sabor aromático⁴⁴.

Xarope de guaco: extrato fluido de guaco..... 100mL
 xarope simples qsp.....1000mL^{44,80}

Pó de guaco: guaco, folhas

Dessecar a droga conveniente mondada, a 40-45°C, pulverizar e passar através do tamis nº VI^{44, 80}.

3.1.10.Posologia.

- Para uso interno: infuso ou decoto a 2%: tomar 50 a 200mL/dia
extrato fluido: 1 a 4mL/dia
tintura: 5 a 20mL/dia
xarope de guaco: 10 a 40mL/dia ^{71, 85}.
- Para uso externo: infuso ou decocto a 5%: aplicar várias vezes ao dia ⁷¹.
- Suco da planta: fazer fricções sobre a parte dolorida ⁷¹.

3.2. CUMARINA

Considera-se cumarina a substância fundamental, referida como lactona do ácido cis-o-hidroxicinâmico, conhecida também pelo nome de ácido cumarinico. A palavra cumarina originou-se do nome popular da planta cumarurana ou cumuru (*Dipteryx odorata* Willd), de onde a substância foi isolada pela primeira vez em 1920^{82, 85}.

Os derivados desta substância constituem um grupo importante de compostos naturais denominado de CUMARINAS, que pode ocorrer tanto na forma livre, como na forma de heterósidos. No grupo das cumarinas encontram-se vários representantes de importância medicinal^{20, 25}.

3.2.1. Propriedades físico-químicas da cumarina.

Cumarina – 1,2 benzopira, lactona do ácido cis-o-cumarínico, anidrido cumarínico. $C_9H_6O_2$, PM 146,14, C-73,96%, H-4,14%, O-21,9%.

Cristal retangular, odor agradável e perfumado, sabor ardente e amargo. Faixa de fusão 68-70°. Um grama dissolve-se em 400mL de água fria e em 50mL de água quente. Solúvel em álcool, clorofórmio, éter e óleos. Solúvel em soluções de

hidróxidos alcalinos. Dissolve-se em alcalis diluídos sob forma de sal, resultando solução corada de amarelo^{20,50,82}.

A cumarina, ao contrário dos composto do seu grupo, não é fluorescente, mas em meio alcalino forma-se o ácido *cis*-o-hidroxicinâmico e sob a ação das radiações UV origina o isômero *trans* que apresenta fluorescência amarelo esverdeada intensa^{38, 82}.

3.2.2. Usos da cumarina.

A cumarina é usada como aromatizante, sendo adicionada em fragrâncias, sabonetes, detergentes, pasta de dente, bebidas alcoólicas e *spray* para neutralizar odores desagradáveis^{41,85}.

Por causa de certas propriedades bioquímicas, é proposta para uso clínico, como, por exemplo, pela habilidade para ativar macrófagos e propriedades imunomoduladoras. A cumarina demonstra ter eficácia na redução de linfodema podendo ser útil no tratamento de câncer de mama e no tratamento de elefantíase. Também há indicações de efeitos espasmolítico, antiinflamatório e broncodilatador^{39,41}.

O uso de cumarina como aromatizante em alimentos foi suspenso devido efeitos hepatotóxicos em ratos e cachorros alimentados com cumarina na ração. A cumarina foi banida nos USA em 1954 baseados em relatórios de hepatotoxicidade em ratos^{41,85}.

3.2.3. Toxicidade da cumarina.

A maioria dos testes para o potencial mutagênico e genotóxico sugere que a cumarina não é um agente genotóxico. Os órgãos-alvo para toxicidade e carcinogenicidade em ratos e

camundongos são primariamente o fígado e pulmão. Entretanto, a relação dose-resposta para toxicidade e carcinogenicidade induzida por cumarina não é linear, com formação de tumor observada somente com doses altas. A cumarina também não mostrou citotoxicidade em células da medula óssea em ratos ^{2, 26, 41}.

Outras espécies de animais são aparentemente resistentes para toxicidade induzida por cumarina ⁴¹.

A exposição humana diária máxima para cumarina de origem dietética, para consumidor de 60kg, foi estimada em 0,02mg/kg/dia. Para fragrâncias de uso em produtos cosméticos é de 0,04mg/kg/dia. A exposição total para ambas as formas é de 0,06mg/kg/dia. Para doses maiores de 100 vezes da quantidade ingerida por humanos, em espécies suscetíveis a resposta, não há efeitos adversos da cumarina ⁴¹.

3.2.4. Ocorrência da cumarina.

A cumarina é um produto de origem natural, porém, pode ser obtida totalmente de forma sintética. De origem natural, pode estar na forma livre ou combinada com açúcares, formando heterósidos, sendo distribuída em diferentes famílias botânicas, como por exemplo: *Rutaceae*, *Orquidaceae*, *Vitaceae*, *Poraceae*, *Rubiaceae*, *Leguminosae*, *Asteraceae*, *Malvaceae*, *Apiaceae* e outras ^{34, 45}.

Das muitas plantas que contém cumarina destacam-se algumas com importância medicinal, exemplificadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1.- Exemplos de plantas medicinais que contém cumarina e resumo de suas indicações terapêuticas

Nome científico	Nome popular	Uso terapêutico
1. <i>Ammi visnaga</i> Lamarck	Paliteira	Diurético, auxilia a eliminação de cálculos renais, usado em casos na asma e bronquite ^{22, 75} .
2. <i>Mellilotus officinales</i> L.	Meliloto	Usada nos distúrbios da coagulação, hemorragias, contusões, e afeções urinárias ^{22,77,85} .
3. <i>Mikania hirsutissima</i> Sprengel	Cipó cabeludo	Usado em coceiras, tosse e em casos de bronquite e como diurético em casos de cistites ^{18,58} .
4. <i>Torresia cearensis</i> Fr.All	Cumarú, Emburana	Usado em tosse, bronquite, asma, afeções pulmonares, cólicas intestinais e uterinas ^{48,84} .
5. <i>Trifolium pratensis</i> L.	Trevo-dos-prados	Usado como antiespasmódico, expectorante e agente dermatológico ¹¹ .

3.2.5. Métodos de identificação e doseamento da cumarina em material de origem vegetal.

Um método rápido de pesquisa das cumarinas em material vegetal utiliza a propriedade mais comum do grupo das cumarinas, que é a presença de fluorescência quando submetida à luz ultravioleta. O método consiste na extração por microsublimação, aquecendo o pó da planta a 100°C por 10 minutos, em um anel metálico sobre uma lâmina coberta por uma lamínula. O sublimado aparece sob forma de gotas incolores ou de cristais aciculares. Este sublimado é dissolvido em 0,5 mL de metanol e aplica-se de 3 a 5 gotas em papel de filtro. Após secar, adiciona-se uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio 2M, que quando exposta a luz ultravioleta adquire fluorescência verde amarelada ¹⁹.

A cromatografia em camada delgada é outra técnica muito utilizada para identificação de cumarina em droga vegetais. Esta técnica é usada para determinação de cumarina em diferentes plantas e de acordo com o material utilizam-se diferentes sistemas cromatográficos ⁹⁰.

Martinelli e Calvino ⁴⁷ desenvolveram um método de identificação por cromatografia em camada delgada e posterior doseamento da cumarina através da densitometria no pó, tintura e alcoolatura das drogas meliloto (*Melilotos officinalis*), fava tonca (*Dypterix odorata*) e liatris (*Liatris odoratissima*). Para este método foi usado silica kieselgel HF254 Merck, como fase estacionária e benzeno contendo 2,5% de metanol, como fase móvel; o revelador foi o ácido fosfomolibdico a 10% em álcool. O doseamento densitométrico foi feito direto na placa cromatografica, usando a absorção UV da cumarina e a

fluorescência da camada de silicagelHF254 excitada mediante a luz UV 254nm. A zona não fluorescente indica onde é presente a cumarina e possibilita a medida direta usando densitômetro.

Chouchi e Barth ¹⁷ determinaram qualitativamente a cumarina e seus derivados citopteno e furanocumarinas do óleo essencial de limão por cromatografia gasosa. Para esta análise, o tempo de retenção e os espectros de massa foram comparados com os produtos puros. O gás de arraste foi o hélio, com vazão de 30mL/min. Os gases auxiliares foram ar e hidrogênio. Para obter a separação foi usada temperatura inicial de 100°C por 3 minutos depois da injeção, de 3°C/min até 230°C, permaneceu a 230°C por 20 minutos. A cumarina teve tempo de retenção de 30 minutos.

Chen e Sheu ¹⁶ testaram os métodos de cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separar 9 cumarinas encontradas na *Angelica Tuhou radix*. Entre as cumarinas temos a cumarina, umbeliferona, columbianitina, psoraleno, acetato de bianetina, ostol, xantotoxina e bergateno. A melhor separação na MECC foi obtida usando o carreador de solução tampão (sulfato dodecil de sódio 15mM-borato de sódio 15mM-dihidrogênio fosfato de 15mM)-acetonitrila. Na CLAE foi usado um gradiente linear de solvente A (água-acetonitrila 8:2) e solvente B (água-acetonitrila-metanol 2:9:9). No tempo zero começou com solvente A, de 0 a 40 minutos foi alterando para solvente B e entre 40-50 minutos usou 100% solvente B. Ambos os métodos foram eficientes, porém, o tempo de análise foi menor em MECC(22minutos) do que em CLAE (42 minutos).

Ganzera e col.³³ usaram as técnicas MECC e CLAE para análise de onze cumarinas, entre elas a cumarina. Na análise foram utilizados corrente eletrolítica e tampão à pH 10,4 preparado com ácido bórico 50mM, tetraborato sódico 10mM e hidróxido de sódio 100mM com voltagem de 25kV e a temperatura do capilar foi de 20°C. Em CLAE, a separação da linha base da mistura foi obtida pelo uso da coluna de fase reversa e um gradiente de solvente acetonitrila-água. Esses métodos foram satisfatórios para determinação das cumarinas contidas no fruto de *Ammi visnaga* e nas raízes de *Peucedanum ostruthium* e *Scopolia carniolica*.

Vilegas e col.⁸⁸ desenvolveram um método para determinação simultânea de cumarina e ácido caurenóico em folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), por cromatografia gasosa capilar. Neste método, o pó das folhas foi macerado em hexano durante 7 dias. O macerato foi filtrado e clarificado por eluição com hexano e clorofórmio em coluna de vidro contendo sílica. As frações recolhidas foram secadas e analisadas por cromatografia gasosa, usando como fase estacionária coluna revestida com polimetilsiloxana. A temperatura da coluna foi programada de 105°C à 15°C/min. até 200°C, de 200°C à 6°C/min. até 240°C, permanecendo por 10 minutos. O hidrogênio foi usado como gás carreador na velocidade linear média de 65cm/s. Este método mostrou-se sensível e reprodutível para análise do pó de guaco.

Aboy e col.¹ estudaram a influência da relação droga:solvente, métodos de extração (percolação e refluxo) e natureza do líquido em soluções de *Mikania glomerata* Sprengel. Neste

estudo o teor de cumarina foi avaliado por CLAE, utilizando coluna de aço inoxidável acoplado com uma pré-coluna Lichrosorb C₁₈, com fase móvel metanol : água (47:53) em vazão de 0,5 mL/min. e a detecção em 275nm por detector UV-vísivel. Concluiu-se que o método utilizado apresentou-se preciso e reprodutível, e a percolação foi o método mais eficiente para extração da cumarina. Cabral e col.¹³ também utilizaram a CLAE em condições parecidas, para determinação de cumarina em *Mikania glomerata* Sprengel e concluíram que o melhor solvente para a extração de cumarina em *M. glomerata* foi solução aquosa básica.

Outras técnicas cromatográficas foram estudadas a fim de conseguir a separação da cumarina de outros derivados cumarínicos, para a determinação dessas substâncias em produtos naturais. Castele e col.¹⁵ estudaram a separação de compostos fenólicos, entre várias substâncias foram estudadas 43 cumarinas, por CLAE em sistema de fase reversa. Shibusawa e col.⁷⁹ separaram, com sucesso, cumarina, esculina e ácido 2, 3 e 4 hidroxicinâmico, aplicando a técnica de cromatografia de contra corrente de alta velocidade. Jonczyk e Wilczynska⁴⁰ determinaram ácido cinâmico, ácido cinamético e cumarina em preparações farmacêuticas, usando CLAE e espectrofotometria. Mazza⁴⁹ determinou cumarina e flavonóides em bebidas alcoólicas por CLAE.

Entre os métodos oficiais, temos o método da A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) 16^a ed. para determinação de cumarina em vinhos por cromatografia gasosa. Neste método, a amostra é extraída com clorofórmio, a fase estacionária utilizada é chromosorb W.AW com 10%

SP1000 (carbowax 20M.TPA). O gás de arraste foi hélio a 30mL/min. e a temperatura da coluna foi de 180°C ⁵.

A A.O.A.C. 16^aed. descreve um método que utiliza a cromatografia em coluna e espectrofotometria para determinação de cumarina, vanilina e etil vanilina em extrato de vanila. As amostras são extraídas com clorofôrmio e o volume completado com isooctano, passando-se em coluna cromatográfica, determinando a absorção de cada fração em 270 e 325nm. A cumarina é determinada em 325nm ⁶.

Na A.O.A.C. 10^aed., o método espectrofotométrico descrito para determinação de cumarina no extrato de vanila requer prévia purificação em coluna cromatográfica e determinação espectrofotométrica na região do visível, através de reação colorimétrica com reagente de diazônio ³.

Existem outras técnicas, além de cromatografia e espectrofotometria, para determinação de cumarina em compostos vegetais como polarografia e eletroforese capilar^{70,95}.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material Botânico.

As partes aéreas da *Mikania glomerata* Sprengel foram fornecidas pelo CPQBA-UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agronômicas – Universidade de Campinas), entidade que cultiva a espécie para fins de pesquisa.

4.1.2. Extrato Fluido de Guaco Padrão.

Extrato fluido: guaco, folha pulverizada..... 1 Kg
álcool: água (2:1) qsp..... 1 L

Foi preparado pelo processo A da Farmacopéia Brasileira 1ªed⁸⁰. O extrato fluido foi preparado inicialmente para estudo e padronização dos métodos. Foi preparado uma segunda vez para o estudo de estabilidade e comparação com amostras compradas no comércio.

4.1.3. Tintura de Guaco Padrão.

Tintura: guaco, folha pulverizada 200g
álcool: água (2:1) qsp..... 1L

A tintura foi preparada pelo processo P da Farmacopéia Brasileira 1ª ed⁸⁰. A tintura foi preparada inicialmente para estudo e padronização dos métodos. Foi preparada uma segunda vez para o estudo de estabilidade e comparação com amostras compradas no comércio.

4.1.4. Xarope de guaco padrão.

Xarope de guaco: extrato fluido de guaco..... 100mL
xarope simples qsp..... 1000mL

Xarope simples: açúcar branco.....850g
água destilada qsp..... 1000mL

O xarope de guaco e o xarope simples foram preparados segundo a Farmacopéia Brasileira 1ª ed⁸⁰. O extrato fluido utilizado foi o mesmo descrito no item **4.1.2.**

Xarope simples com conservante:

Açúcar branco.....850g
Nipagin.....1g
Água destilada qsp....1000mL

Ao xarope simples foi adicionado nipagin para testar a interferência do conservante na varredura espectral da solução do padrão de cumarina na derivada de primeira ordem.

4.1.5. Amostras adquiridas do comércio.

Das amostras adquiridas no comércio foram escolhidas 9 empresas fabricantes de extrato e tintura de guaco. Empresas codificadas como 1, 2, 3, 4 e 5 vendem o produto direto ao

paciente como forma farmacêutica. As empresas codificadas como 6, 7 e 8 vendem o produto como insumo farmacêutico para laboratórios e farmácias de manipulação. A empresa 9 trata-se de um órgão público que fabrica o extrato fluido sem finalidade comercial como um semi-elaborado na fabricação de xarope de guaco.

As amostras foram adquiridas nas seguintes quantidades:

Empresa 1: extrato fluido - frasco 60mL.

tintura - frasco 100mL.

Empresa 2: extrato fluido - frasco 100mL.

tintura - frasco 100mL.

Empresa 3: extrato fluido - frasco 200mL.

Empresa 4: extrato fluido - frasco 60mL.

Empresa 5: tintura - frasco 100mL,

Empresa 6: extrato fluido - frasco 1L.

tintura - frasco 1L.

Empresa 7: extrato fluido - frasco amostra grátis.

tintura – frasco amostra grátis.

Empresa 8: extrato fluido - frasco amostra grátis.

tintura – frasco amostra grátis.

Empresa 9: extrato fluido - frasco amostra grátis.

Foi adquirida uma amostra comercial de xarope de guaco:

Empresa 9: xarope de guaco – frasco de 100mL

4.1.6. Equipamento.

Espectrofotômetro Shimadzu 1601 UV-Vísivel.

Peagâmetro Digimed DM 2.1.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Validação do método oficial de doseamento de cumarina por espectrofotometria no visível após reação de diazotação da A.O.A.C. 10^a ed.³ no extrato fluido e tintura de guaco.

4.2.1.1. Preparação de reagentes.

Solução de carbonato de sódio 1%:

dissolveram-se 5g de NaCO_3 em água destilada, completando-se o volume para 500mL.

Reagente de diazonium: (1) dissolveram-se 0,7g de p-nitroanilina em 9mL de HCl, diluindo-se para 100mL com água destilada. (2) Dissolveram-se 5g de NaNO_2 em água destilada para 100mL. Deixou-se esfriar cada uma das soluções. Transferiram-se alíquotas de 5mL de cada solução para balão de 100mL, misturando-se por 5 minutos à 3°C. Adicionaram mais 10mL da solução (2), deixando 5 minutos a 3°C e completando o volume com água destilada gelada.

Solução de acetado de chumbo: dissolveram-se 50g de $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ em água destilada quente com diluição para 1 litro. Após esfriar, a solução foi filtrada.

Solução do padrão de cumarina: dissolveram-se 0,2g de cumarina em 3mL de álcool em balão volumétrico de 100mL, diluindo com água destilada (1mL = 2mg de cumarina).

4.2.1.2 Construção da curva de calibração da solução do padrão de cumarina.

Foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0mL de solução de cumarina à 0,2% para balões volumétricos de 200mL e foram adicionados, aproximadamente, 80mL de água destilada. Transferiram-se para cada balão, 5mL de solução de acetato de chumbo, completando-se os volumes dos balões com água destilada. Após homogeneização, as soluções foram filtradas. Aos filtrados foram adicionados 0,2g de oxalato de sódio, aguardando tempo de 5 minutos. Novamente as soluções foram filtradas, rejeitando-se os primeiros mL. Transferiram-se alíquotas de 5mL para balões volumétricos de 100mL, adicionado-se 15mL de água destilada e 10mL de solução de carbonato de sódio, aquecendo-se em banho de água por 5 minutos e aguardando resfriamento. Foram adicionados a cada balão 10mL de reagente diazonium completando-se os volumes dos balões com água. As soluções foram filtradas, após terem aguardado o tempo de 1 hora e meia. As leituras das absorbâncias foram efetuadas a 490nm, utilizando água destilada como branco.

4.2.1.3. Aplicação do método ao extrato fluido e tintura de guaco padrões.

Foram transferidas alíquotas de 2mL do extrato fluido e 5mL de tintura em balões volumétricos de 200mL e procedeu-se de acordo com item **4.2.1.2.** Foram preparadas 16 soluções de cada amostra para determinação do coeficiente de variação.

4.2.1.4. Teste de recuperação para o método da A.O.A.C. 10^a ed.

O teste de recuperação constituiu em adicionar uma quantidade de extrato fluido de guaco padrão com uma quantidade de solução padrão de cumarina a 0,2% nas seguintes proporções:

I - 2mL de extrato fluido + 1mL de padrão de cumarina

II - 2mL de extrato fluido + 2mL de padrão de cumarina.

O teste foi feito em triplicada de acordo com o item **4.2.1.2.** O cálculo para obtenção da porcentagem de recuperação foi determinado utilizando a concentração de uma alíquota de 2mL de solução padrão de cumarina e de uma alíquota de 2mL de extrato fluido. O mesmo procedimento foi realizado com a tintura.

4.2.2. Padronização do método de doseamento de cumarina por espectrofotometria derivada para extrato fluido e tintura de guaco.

Para padronização do método foram afixados os seguintes parâmetros:

Solvente: HCl 0,1M

Ordem da derivada: primeira

Delta lambda: 4nm

Velocidade da varredura: rápida

Intervalo de varredura: 400 a 250nm

Concentração analítica: 10 a 14µg/mL

Leitura efetuada: 320nm

Método de determinação quantitativa: zero crossing

4.2.2.1. Reagentes utilizados:

Solução de acetado de chumbo 5%:

dissolveram-se 25 g de $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ em água destilada, transferindo-se para balão volumétrico de 500mL, completando o volume e filtrando.

Solução do padrão de cumarina:

foi dissolvido 0,1g de cumarina em 5mL de etanol em balão volumétrico de 50mL e completou-se o volume com água destilada (1mL = 2mg de cumarina).

Solução de ácido clorídrico 0,1M:

foram transferidos, em proveta, 166mL de HCl concentrado para balão volumétrico de 1000mL, contendo a metade do seu volume com água.

Completou-se o volume com água destilada, resultando-se uma solução 2M. Desta solução foram transferidos 50mL para balão volumétrico de 1000mL, completando-se o volume com água destilada resultando-se em solução de HCl 0,1M.

4.2.2.2. Varredura espectral da solução do padrão de cumarina.

Transferiram-se 3mL de solução padrão de cumarina para um balão volumétrico de 100mL, adicionando-se aproximadamente 20mL de água destilada e 5mL de solução de acetato de chumbo 5%. Completou-se o volume com água destilada. Filtrou-se, desprezando os primeiros 10mL, transferindo-se uma alíquota de 10mL do filtrado para um balão de 50mL, completou-se o volume com solução de HCl 0,1M, resultando uma solução de concentração à 12µg/mL. A varredura espectral foi realizada na faixa de 400nm a 250nm contra branco de solução de HCl 0,1M.

4.2.2.3. Varredura espectral do extrato fluido de guaco padrão.

Foram transferidos 2mL do extrato fluido para balão volumétrico de 100mL e prosseguiu-se de acordo com o item **4.2.2.2.**

4.2.2.4. Varredura espectral da tintura de guaco padrão.

Foram transferidos 5mL da tintura para balão volumétrico de 100mL e prosseguiu-se de acordo com o item **4.2.2.2.**

4.2.2.5. Pesquisa da interferência do solvente utilizado na preparação de extrato fluido e tintura de guaco.

Foram transferidos 2mL de solução de álcool/água 2:1 para balão volumétrico de 100mL e prosseguiu-se de acordo com o item **4.2.2.2.**

4.2.2.6. Construção da curva de calibração da solução do padrão de cumarina.

Foram transferidos alíquotas de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0mL para balões volumétricos de 100 mL, seguindo-se o procedimento de acordo com o item **4.2.2.2.** As derivadas das leituras das absorbâncias destas soluções foram efetuadas a 320nm, empregando-se como branco HCl 0,1M.

4.2.2.7. Aplicação do método para extrato fluido e tintura de guaco padrões.

Alíquotas de 2mL de extrato fluido e 5mL de tintura foram transferidas para balões

volumétricos de 100mL, e prosseguiu-se de acordo com o procedimento do item **4.2.2.2.** As derivadas das leituras das absorbâncias foram efetuadas a 320nm, comparando-se com a solução do padrão de cumarina à 12µg/mL. Foram feitas 10 determinações de cada uma das amostras para avaliação do coeficiente de variação.

4.2.2.8. Teste de recuperação do método de espectrofotometria derivada para o extrato fluido de guaco padrão.

O teste de recuperação constituiu-se em adicionar uma determinada quantidade de extrato fluido com uma quantidade de solução padrão, nas seguintes proporções:

- I - 1mL de solução padrão de cumarina + 2mL de extrato fluido.
- II - 2mL de solução padrão de cumarina + 2mL de extrato fluido.
- III - 2mL de solução padrão de cumarina + 1mL de extrato fluido.

O teste foi feito em duplicata de acordo com item **4.2.2.2.** O cálculo para obtenção da porcentagem de recuperação foi determinada utilizando a concentração de alíquotas de 1 e 2mL de solução padrão de cumarina e com alíquota de 2mL de extrato fluido.

4.2.2.9. Teste de linearidade do método de espectrofotometria derivada para extrato fluido de guaco padrão.

O teste de linearidade foi feito preparando-se solução padrão de cumarina de 1mg/mL e adicionando-se alíquotas de 1,2,3,4 e 5mL à 1mL do extrato fluido e prosseguindo-se de acordo ao item **4.2.2.7.**

4.2.3. Estudo para determinação de taninos em extrato fluido e tintura de guaco de acordo com Farmacopéia Européia 2^aed. e Farmacopéia Brasileira 4^a ed.^{27,29}:

4.2.3.1. Reagentes utilizados:

Ácido fosfotúngstico SR: foram fervidos 10,0 g de tungstato de sódio sob refluxo, com 5mL de ácido fosfórico, 2,0g de ácido fosfomolibdico e 75mL de água destilada durante 2 horas. A solução foi resfriada e o volume foi completado para 100mL com água destilada.

Solução de carbonato de sódio: foram pesados 15,0g de carbonato de sódio e dissolvidos em balão volumétrico de 100mL com água destilada.

Solução padrão de pirogalol: foram dissolvidos 50,0mg de pirogalol R em água destilada e completado o volume para 100mL.

4.2.3.2. Determinação do padrão de pirogalol.

Foram diluídos 5mL da solução de pirogalol para 100mL com água destilada. Desta solução foi misturado 5mL com 1mL de ác. fosfotungstico SR e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 15%. Exatamente 2 minutos após a adição do carbonato de sódio, efetuou-se a medida de absorbância a 715nm usando água destilada como branco.

4.2.3.3. Doseamento de taninos no extrato fluido e tintura de guaco padrões.

Alíquota de 2mL de extrato fluido e 5mL de tintura foram diluídos para 50mL com água destilada. Destas soluções foram transferidos 10mL para balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com água destilada. Destas últimas diluições retiraram-se duas alíquotas de 5mL (A) e 10mL (B). Na alíquota (A) foi adicionado 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico e diluídos em balão volumétrico de 50mL com solução de carbonato de sódio 15%; exatamente 2 minutos após a adição do carbonato de sódio foi efetuada a leitura de absorbância a 715 nm utilizando-se água destilada como branco.

Na alíquota (B) foi adicionado 0,10g de pó de pele SCR, agitando-se vigorosamente em agitador mecânico, durante uma hora. Filtrou-se,

e deste filtrado transferiu-se uma alíquota de 5mL para um balão volumétrico de 50mL e prosseguiu-se como descrito para alíquota (A).

4.2.4. Avaliação das amostras de extrato fluido e tintura de guaco encontradas no mercado.

As amostras adquiridas no comércio foram analisadas e comparadas com o resultados das preparações padrões nas seguintes análises:

4.2.4.1. pH

O pH das amostras foi medido diretamente em peagâmetro a 25°C²⁸.

4.2.4.2. Densidade

A determinação da densidade foi feita por picnômetro de Geissler à temperatura de 25°C²⁸.

4.2.4.3. Teor de resíduo seco.

Em cápsula de porcelana previamente tarada foram colocados 5mL da amostra e submetidos à secagem em estufa a 105°C até peso constante^{28,93}.

4.2.4.4. Determinação do teor de cumarina.

4.2.4.4.1. Reagentes utilizados.

Foram utilizados reagentes descritos no item **4.2.2.1.**

4.2.4.4.2. Determinação do padrão de cumarina.

Transferiram-se 3mL de solução padrão para balão volumétrico de 100mL, adicionando 20mL de água destilada e 5mL de solução de acetado de chumbo 5%. Completou-se o volume com água destilada. A solução foi filtrada, desprezando os primeiros 10mL. Transferiu-se uma alíquota de 10ml do filtrado para balão volumétrico de 50mL. Completou-se o volume com solução de HCl 0,1M, obtendo-se uma solução de padrão de cumarina à 12µg/mL. A varredura espectral foi efetuada na faixa de 400nm a 250nm no espectro da derivada de primeira ordem contra um branco de solução de HCl 0,1 M. A leitura da absorbância foi efetuada a 320nm.

4.2.4.4.3. Doseamento das amostras comerciais.

As amostras comerciais foram diluídas de acordo com a concentração de cumarina. Esta diluição foi obtida de modo experimental, observando-se que na primeira diluição, adicionaram-se 5mL de acetato de chumbo 5%. Filtrou-se, e na última diluição o volume foi completado com solução de HCl 0,1M. As leituras de absorbância foram efetuadas em duplicata a 320nm contra um branco de solução de HCl 0,1M após varredura espectral de 400nm a 250nm em espectro da derivada de primeira ordem.

4.2.4.5. Determinação do teor de taninos.

4.2.4.5.1. Reagentes utilizados.

Foram utilizados os reagentes descritos no item **4.2.3.1**

4.2.4.5.2. Determinação do padrão de pirogalol.

Foi utilizado o procedimento descrito no item **4.2.3.2.**

4.2.4.5.3. Doseamento das amostras comerciais.

Polifenóis totais – foram misturados 5mL da amostra já diluída com 1mL de solução de ácido fosfotúngstico e foram diluídos para 50mL com solução de carbonato de sódio 15%. Exatamente 2 minutos após a adição do carbonato de sódio, efetuou-se a leitura da absorbância a 715nm, usando água destilada como branco.

Polifenóis que não precipitam com pó de pele – à 10mL da amostra já diluída, foram adicionados 0,10g de pó de pele SCR e agitou-se vigorosamente em um agitador mecânico, durante uma hora. Filtrou-se e adicionou-se 1mL de solução de ácido fosfotúngstico R a 5mL do filtrado, diluindo-se para 50mL com solução de carbonato de sódio 15%. Exatamente 2 minutos após a adição do carbonato de sódio efetuou-se a

leitura da absorbância a 715nm
usando água destilada como branco.

4.2.4.6. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada.

Sistema 1 ⁶⁹

Fase estacionária: silicagel 60

Fase móvel: heptano/acetona (10:3)
desenvolvimento duplo

Padrão: estigmasterol

Revelador: sulfovanílico ⁹⁰

Sistema 2 ⁶⁹

Fase estacionária: silicagel 60

Fase móvel: heptano/acetona (10:3)
desenvolvimento duplo

Padrões: cumarina

Revelador: KOH 5% - visualizar em luz UV
365 nm ⁹⁰

4.2.5. Estudo de estabilidade do extrato fluido e tintura de guaco.

O extrato fluido e tintura foram preparados e fracionados em frascos de vidro âmbar de 30mL. A análise inicial foi realizada na preparação do extrato fluido e tintura. Os frascos foram armazenados em temperaturas: ambiente, 40°C, 45°C e 60°C. Foram programadas análises periódicas nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 365 dias e dois anos para as frações armazenadas nas temperaturas ambiente, 40°C e 45°C. Intervalos de 15, 30, 45, 60 e 90 dias para frações armazenadas a 60°C. Os parâmetros de controle de qualidade utilizados foram:

4.2.5.1. pH

O pH das amostras foi determinado diretamente em peagâmetro a temperatura de 25°C ²⁸.

4.2.5.2. Resíduo seco.

Em cápsula de porcelana previamente tarada foi colocado 5mL de amostra e submetido a secagem em estufa a 105°C até peso constante ^{28, 93}.

4.2.5.3. Teor de cumarina.

4.2.5.3.1 Reagentes utilizados:

Foram utilizados os reagentes descritos no item **4.2.2.1.**

4.2.5.3.2. Determinação do padrão de cumarina.

Utilizou-se o procedimento descrito no item **4.2.4.4.2.**

4.2.5.3.3. Doseamento das amostras.

Transferiram-se 2mL do extrato fluido e 5mL da tintura para balões volumétricos de 50 mL, procedendo-se de acordo ao item **4.2.4.4.2..**

4.2.5.4. Análise qualitativa do extrato fluido e tintura por cromatografia em camada delgada.

Seguiu-se o procedimento do item **4.2.4.6.**

4.2.6. Comparação dos métodos de preparação de extrato fluido de guaco.

Foram preparados novos extratos de guaco pelo método A e C da Farmacopéia Brasileira 2^aed³⁰. Ambos usando como líquido extrator álcool/ água (2:1). Esses extratos foram comparados usando os seguintes parâmetros.

4.2.6.1. pH

Seguiu-se o procedimento descrito no item **4.2.4.1.**

4.2.6.2. Resíduo seco.

Seguiu-se o procedimento descrito no item **4.2.4.3.**

4.2.6.3. Teor de cumarina.

Procedeu-se como descrito no item **4.2.4.4.**

4.2.6.4. Teor de taninos.

Procedeu-se conforme descrito no item **4.2.4.5.**

4.2.7. Estudo da aplicação do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem em xarope de guaco.**4.2.7.1. Reagentes utilizados.**

Foram utilizados os reagentes descritos no item **4.2.2.1.**

4.2.7.2. Varredura espectral da solução de xarope de guaco.

Foram transferidos 5mL do xarope de guaco padrão para balão volumétrico de 50mL. Adicionaram-se aproximadamente 20mL de água destilada e 5mL de solução de acetato de chumbo 5%, completando-se o volume com água destilada. Filtrou-se, desprezando os primeiros 10mL. Foi transferida uma alíquota de 10mL do filtrado para balão volumétrico de 25mL. O volume foi completado com solução de HCL 0,1M. A varredura espectral foi realizada na faixa de 400nm a 190nm contra branco de solução HCL 0,1M.

4.2.7.3. Pesquisa de interferentes.

Foram comparadas as varreduras espectrais na derivada de primeira ordem da solução de xarope de guaco padrão com as varreduras de xarope simples e xarope simples com conservante. Foi utilizado o procedimento descrito no item **4.2.7.2.**

4.2.7.4. Determinação do padrão de cumarina.

Utilizou-se o procedimento descrito no item **4.2.4.4.2.**

4.2.7.5. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco.

Foi transferido 5mL do xarope de guaco padrão para balão de 50mL e prosseguiu-se de acordo com item **4.2.4.4.2**. As derivadas das leituras de absorbâncias foram efetuadas a 320nm, comparando-se com a solução do padrão de cumarina diluída à concentração de 12 µg/mL. Foram feitas 5 determinações para avaliação do desvio padrão.

4.2.7.6. Teste de recuperação do método de espectrofotometria derivada para o xarope de guaco.

O teste de recuperação constituiu em adicionar alíquota de solução de padrão de cumarina à 0,15mg/mL ao xarope de guaco padrão nas seguintes proporções:

I – 5mL de solução de padrão de cumarina + 5mL de xarope de guaco padrão.

II– 10mL de solução de padrão de cumarina + 5mL de xarope de guaco padrão.

O teste foi feito em duplicada de acordo com o procedimento do item **4.2.7.2**. O cálculo para obtenção da porcentagem de recuperação foi determinado utilizando a concentração determinada da alíquota de 10mL de solução de padrão de cumarina e de 5mL de xarope de guaco padrão.

4.2.7.7. Teste de linearidade do método de espectrofotometria derivada para xarope de guaco.

O teste de linearidade foi feito adicionando extrato fluido de guaco padrão ao xarope simples nas concentrações de: 5, 10, 15 e 20%. Determinou-se a concentração de cumarina em duplicada de cada solução, de acordo com o procedimento do item **4.2.7.5.**

4.2.7.8. Determinação do teor de cumarina na amostra comercial de xarope de guaco.

Foram transferidos 5mL da amostra comercial de xarope de guaco para balão de 50mL e prosseguiu-se de acordo com o item **4.2.7.5.**

V - RESULTADOS

5.1. Valores obtidos do estudo de doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação pela A.O.A.C. 10^a ed. ³ em extrato fluido e tintura de guaco.

5.1.1. Construção da curva de calibração do padrão de cumarina.

Tabela 5.1. - Valores da curva da solução do padrão da cumarina pelo método A.O.A.C. 10^a ed.

	Concentração em µg/mL	Absorbância
1	0,5	0,047
2	1,0	0,118
3	1,5	0,174
4	2,0	0,250
5	2,5	0,299

Figura 5.1.- Curva de calibração da solução do padrão da cumarina pelo método da A.O.A.C. 10^a ed, onde obteve-se $y=0,1272x - 0,0132$ e $R^2=0,9963$

5.1.2. Determinação de cumarina nos extrato fluido e tintura de guaco padrões por espectrofotometria visível após reação de diazotação segundo o método da A.O.A.C. 10^a ed.

Tabela 5.2.-Valores obtidos da determinação de cumarina nas amostras de extrato e tintura de guaco padrão pelo método da A.O.A.C. 10^a ed.

	Concentração de cumarina no extrato fluido em mg/mL	Concentração de cumarina na tintura em mg/mL
1	4,26	1,70
2	5,14	1,48
3	3,70	1,89
4	4,23	1,39
5	3,78	1,45
6	3,93	2,38
7	3,71	1,60
8	4,52	1,72
9	3,72	1,15
10	4,70	1,76
11	4,78	1,23
12	4,96	1,93
13	5,51	1,62
14	4,87	1,69
15	5,26	1,58
16	5,05	1,48

Cálculo utilizado para determinação da cumarina na amostra:

$$Ca_{(mg/mL)} = \frac{Aa \times Cp \times 4000}{Ap \times Va}$$

Aa= absorbância da amostra

Ap= absorbância do padrão

Cp= concentração da leitura do padrão
(mg/mL)

Ca= concentração encontrada na amostra

Va= volume da tomada de ensaio em mL

5.1.3. Resultados estatístico do estudo de doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação segundo o método da A.O.A.C. 10^a ed.

Tabela 5.3.-Resultados estatísticos para doseamento da cumarina pelo método da A.O.A.C. 10^a ed.

	Extrato fluido (n=16)	Tintura (n=16)
Média (mg/mL)	4,50	1,62
Desvio médio	0,52	0,69
Desvio padrão	0,61	0,35
Variância	0,37	0,12
Desvio relativo	0,135	0,21
Coefficiente de variação	13,55%	21,60%

5.1.4. Valores obtidos no teste de recuperação do estudo de doseamento de cumarina por espectrofotometria visível após reação de diazotação segundo o método da A.O.A.C. 10^a ed.

Tabela 5.4.- Valores obtidos no teste de recuperação do método da A.O.A.C. 10^a ed..

	% Recuperação
Extrato	I – 98,00*
	II – 99,00*
Tintura	I – 87,5*
	II – 82,5*

*Obs.: Média de valores de 2 determinações

Cálculo:

$$\% = \frac{F - A}{P} \times 100$$

F = amostra adicionada de padrão com valor conhecido

A = amostra sem adicionar padrão

P = quantidade de padrão adicionada na amostra

5.2. Valores obtidos da padronização do método de doseamento de cumarina por espectrofotometria por derivada de primeira ordem em extrato fluido e tintura de guaco.

5.2.1. Varreduras espectrais obtidas.

Figura 5.2. Varreduras espectrais obtidas e suas respectivas derivada de primeira ordem: (A) solução de cumarina, (B) derivada de primeira ordem da solução de cumarina, (C) solução do extrato fluido de guaco, (D) derivada de primeira ordem da solução de extrato fluido de guaco, (E) solução de tintura de guaco, (F) derivada de primeira ordem da solução de tintura de guaco.

5.2.2. Varreduras espectrais obtidas da pesquisa da interferência do solvente utilizado para preparação de extrato fluido e tintura de guaco .

Figura 5.3. (A) Varredura espectral da solução de álcool/água (2:1), (B) derivada de primeira ordem da varredura espectral da solução de álcool/água (2:1).

5.2.3. Determinação da curva de calibração da solução do padrão de cumarina pelo método da espectrofotometria derivada de primeira ordem.

Tabela 5.5.-Valores da curva da solução do padrão de cumarina pelo método da espectrofotometria derivada de primeira ordem

	Concentração do padrão de cumarina em $\mu\text{g/mL}$	$dA/d\lambda$ na absorbância em 320nm
1	4	- 0,0045
2	6	- 0,0071
3	8	- 0,0090
4	10	- 0,0111
5	12	- 0,0148
6	14	- 0,0162
7	16	- 0,0203
8	18	- 0,0212
9	20	- 0,0236
10	22	- 0,0266
11	24	- 0,0283

Obs.: A curva de calibração foi construída em valores absolutos de $dA/d\lambda$

Figura 5.4.- Curva de calibração da solução do padrão da cumarina pelo método da espectrofotometria derivada, em 320nm, onde se obteve: $y = 0,0012X - 0,0004$ e $R^2 = 0,9951$

5.2.4. Valores obtidos da determinação do teor de cumarina pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem no extrato fluido e tintura de guaco padrão.

Tabela 5.6.- Valores obtidos da determinação de cumarina no extrato fluido de guaco padrão – método da espectrofotometria derivada de primeira ordem.

	Concentração em mg/mL
1	3,82
2	3,71
3	3,71
4	3,86
5	3,90
6	3,78
7	3,88
8	3,67
9	3,71
10	3,86

Tabela 5.7.- Valores obtidos da determinação de cumarina no extrato fluido de guaco padrão – método da espectrofotometria derivada de primeira ordem- Repetição após 2 semanas.

	Concentração em mg/mL
1	3,67
2	3,92
3	3,79
4	3,84
5	3,90

Tabela 5.8.- Valores obtidos da determinação de cumarina no extrato fluido de guaco padrão – método da espectrofotometria derivada de primeira ordem - Repetição após 4 semanas.

	Concentração em mg/mL
1	3,76
2	3,89
3	3,89
4	3,87
5	3,80

Tabela 5.9.- Valores obtidos da determinação de cumarina na tintura de guaco padrão – método da espectrofotometria derivada de primeira ordem.

	Concentração em mg/mL
1	1,10
2	1,10
3	1,09
4	1,12
5	1,10
6	1,08
7	1,09
8	1,14
9	1,12
10	1,12

Cálculo da teor de cumarina pelo método da espectrofotometria derivada de primeira ordem:

$$Ca_{(mg/mL)} = \frac{Aa \times Cp \times 500}{Ap \times Va}$$

Aa= absorbância da amostra

Ap= absorbância do padrão

Cp= concentração da leitura do padrão
(mg/mL)

Ca= concentração encontrada na amostra

Va= volume da tomada de ensaio em mL

5.2.5. Resultados estatísticos do método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para dosagem de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco padrões.

Tabela 5.10.- Resultados estatísticos do doseamento do método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para extrato fluido e tintura de guaco padrão.

	Extrato fluido (n=10)	Extrato fluido após 2 semanas (n=5)	Extrato fluido após 4 semanas (n=5)	Tintura (n=10)
Média (mg/mL)	3,79	3,82	3,84	1,10
Desvio médio	0,074	0,076	0,044	0,014
Desvio padrão	0,08	0,10	0,053	0,019
Variância	0,0064	0,01	0,0028	0,0003
Desvio relativo	0,021	0,026	0,013	0,017
Coeficiente de variação	2,10%	2,60%	1,38%	1,72%

5.2.6. Valores obtidos no teste de recuperação do método da espectrofotometria derivada de primeira ordem para extrato fluido de guaco padrão.

Tabela 5.11.- Valores obtidos no teste de recuperação do extrato fluido de guaco padrão - método de espectrofotometria derivada de primeira ordem .

	% recuperação
I	103,37
II	102,50
III	103,75

Obs.: Os valores são médias de duas determinações, com diferença <1%.

Cálculo:

$$\% = \frac{F - A}{P} \times 100$$

F = amostra adicionada com padrão de valor conhecido

A = amostra sem adicionar padrão

P = quantidade de padrão adicionada na amostra

5.2.7. Valores obtidos no teste de linearidade do método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para extrato fluido de guaco padrão.

Tabela 5.12. – Concentrações calculadas no teste de linearidade empregando método da espectrofotometria derivada no extrato fluido de guaco padrão.

Quantidade de cumarina adicionada ao extrato fluido de guaco em mg/ml	Concentração determinada no extrato fluido de guaco em mg/mL
0	3,80
1	4,67
2	5,70
3	6,64
4	7,66
5	9,01

Obs.: Média de duas determinações, com diferença <1%.

Figura 5.5.- Curva do teste de linearidade (tabela 5.12), em que obteve-se $R^2=0,9976$.- (*) e (**) correspondem respectivamente aos valores em mg/mL do padrão de cumarina adicionada ao extrato e mg/mL determinado na análise.

5.3. Estudo para determinação de taninos em extrato fluido e tintura de guaco padrões de acordo com Farmacopéia Européia 2^aed.²⁷ e Farmacopéia Brasileira 4^a ed.²⁹.

Tabela 5.13. - Determinação de taninos no extrato fluido de guaco padrões.

	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	% de tanino
E'	0,3986	0,2142	0,1844	1,50
E''	0,3922	0,2156	0,1766	1,44
E'''	0,3872	0,2065	0,1807	1,47
E''''	0,3902	0,2164	0,1707	1,39

Tabela 5.14.- Determinação de taninos na tintura padrão de guaco.

	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	% de tanino
T'	0,3430	0,2164	0,1266	0,4135
T''	0,3584	0,1630	0,1954	0,5018
T'''	0,3668	0,1991	0,1677	0,4307
T''''	0,3684	0,2059	0,1627	0,4178

Cálculo:

$$\frac{5,25.(A_1-A_2)}{V.A_3}$$

A₁= Absorbância sem pó de pele

A₂= Absorbância com pó de pele

A₃= Absorbância do padrão

V= Alíquota

5,25= 1,25 x 4,2 que são respectivamente a constante resultante da quantidade de taninos determinada em pirogallol multiplicado pelo fator obtido em comparação com método gravimétrico⁸³.

5.4. Avaliação das amostras de extrato fluido e tintura encontradas no mercado.

5.4.1. Avaliação da apresentação do produto.

Tabela 5.15. Parâmetros avaliados nas embalagens dos extratos fluidos e tinturas de guaco vendidos no mercado como forma farmacêutica diretamente ao consumidor.

	Nome científico da planta	Prazo de validade	Informações legais*	Especificação: Produto isento de registro	nº de lote	Posologia no rótulo
Extrato fluido Empresa 1	Não consta	5 anos	De acordo	De acordo	Não tem	Não tem
Tintura Empresa 1	Não consta	4 anos	De acordo	De acordo	Tem	Não tem
Extrato fluido Empresa 2	Não consta	2 anos	De acordo	De acordo	Tem	Não tem
Tintura Empresa 2	Não consta	2 anos	De acordo	De acordo	Tem	Não tem
Extrato fluido Empresa 3	Consta	5 anos	De acordo	De acordo	Tem	Tem
Extrato fluido Empresa 4	Não consta	4 anos	De acordo	De acordo	Tem	Tem
Tintura Empresa 5	Consta	2 anos	De acordo	Não consta	Não tem	Não tem

Obs.:* Informações legais: nome do farmacêutico responsável, endereço da empresa e CGC.
As amostras foram adquiridas em farmácias da cidade de São Paulo - SP no período de setembro à outubro 1999.

Tabela 5.16. Parâmetros avaliados dos extratos fluidos e tinturas de guaco vendidos como insumo farmacêutico para laboratórios e farmácias de manipulação.

	Nome científico da planta	Prazo de validade	Laudo analítico
Extrato fluido Empresa 6	Consta	2 anos	Tem
Tintura Empresa 6	Consta	2 anos	Tem
Extrato fluido Empresa 7	Consta	2 anos	Não tem
Tintura Empresa 7	Consta	2 anos	Não tem
Extrato fluido Empresa 8	Consta	2 anos	Tem
Tintura Empresa 8	Consta	2 anos	Tem
Extrato fluido Empresa 9	Consta	2 anos	Não tem

Obs.: Amostras das empresas 7, 8 e 9 foram doadas como amostras grátis.
As amostras foram adquiridas no prazo de outubro de 1999 à julho de 2000.

5.4.2. pH

Tabela 5.17.- Valores de pH dos extratos fluidos e tinturas de guaco comerciais determinados a temperatura de 25°C.

	Extrato fluido pH	Tintura pH
Empresa 1	5,40	6,33
Empresa 2	5,48	5,46
Empresa 3	5,12	-
Empresa 4	5,91	-
Empresa 5	-	6,08
Empresa 6	5,57	6,25
Empresa 7	5,88	5,88
Empresa 8	5,57	5,64
Empresa 9	5,90	-
Padrão	5,72	5,72

5.4.3. Densidade.

Tabela 5.18. – Valores de densidade dos extratos e tinturas de guaco comerciais a temperatura de 25°C.

	Extrato fluido Densidade	Tintura Densidade
Empresa 1	0,9631	0,9113
Empresa 2	0,9732	0,9676
Empresa 3	0,9761	-
Empresa 4	0,9816	-
Empresa 5	-	0,9286
Empresa 6	0,9121	0,8893
Empresa 7	0,9278	0,9210
Empresa 8	0,9794	0,9662
Empresa 9	0,9775	-
Padrão	0,9561	0,9299

5.4.4. Determinação do teor de resíduo seco*.

Tabela 5.19.- Teor de resíduo seco dos extratos fluidos e tinturas de guaco comerciais.

	Extrato fluido % de resíduo seco	Tintura % de resíduo seco
Empresa 1	2,00	0,75
Empresa 2	1,88	1,10
Empresa 3	1,78	-
Empresa 4	2,56	-
Empresa 5	-	1,28
Empresa 6	1,94	1,14
Empresa 7	4,59	3,26
Empresa 8	3,60	1,85
Empresa 9	3,84	-
Padrão	10,25	3,95

* Média de duas determinações com diferença < 1%.

Gráfico 5.1. – Representação do teor de resíduo seco nas amostras comerciais de extratos fluidos (E) e extrato padrão, de acordo com a tabela 5.19.

Gráfico 5.2. – Representação do teor do resíduo seco nas amostras comerciais de tinturas (T) e tintura padrão, de acordo com a tabela 5.19.

5.4.5. Determinação do teor de cumarina.

Tabela 5.20. – Teor de cumarina em extratos fluidos de guaco comerciais:

Extrato	Alíquota (mL)	Diluição	Teor de cumarina (mg/mL)*
Empresa 1	5	62,5	0,16
Empresa 2	5	62,5	0,13
Empresa 3	10	62,5	Traços
Empresa 4	10	62,5	Traços
Empresa 6	10	500	0,54
Empresa 7	5	500	1,05
Empresa 8	5	125	0,40
Empresa 9	5	250	0,76
Padrão	2	500	2,94

* Média de três determinações, com diferença < 1%

Tabela 5.21. – Teor de cumarina em tinturas de guaco comerciais:

Tintura	Alíquota (mL)	Diluição	Teor de cumarina (mg/mL)*
Empresa 1	10	62,5	0,15
Empresa 2	10	62,5	0,10
Empresa 5	10	250	0,42
Empresa 6	10	250	0,31
Empresa 7	5	250	0,72
Empresa 8	5	125	0,24
Padrão	5	500	1,27

* Média de três determinações com diferença < 1%

Cálculo: Teor de cumarina = $\frac{Abs_A \times C_P \times D}{Abs_P \times A}$

Abs_A = absorbância da amostra

Abs_P = absorbância do padrão

C_P = concentração do padrão em mg/mL

A = alíquota

D = diluição

Gráfico 5.3.– Representação do teor de cumarina nas amostras comerciais de extratos fluidos (E) e extrato fluido padrão, de acordo com a tabela 5.20.

Gráfico 5.4. – Representação do teor de cumarina nas amostras comerciais de tintura(T) e tintura padrão, de acordo com a tabela 5.21.

5.4.6. Determinação do teor de taninos.

Tabela 5.22. – Teor de taninos em extratos fluidos de guaco comerciais.

Extrato	Aliquota (mL)	Diluição	Teor de taninos em %*
Empresa 1	3	2000	0,17
Empresa 2	3	2000	0,20
Empresa 3	5	500	0,08
Empresa 4	5	500	0,05
Empresa 6	5	1000	0,08
Empresa 7	5	2500	0,30
Empresa 8	2	1000	0,27
Empresa 9	5	1000	0,06
Padrão	2	5000	1,45

* Média de três determinações com diferença <1%

Tabela 5.23. – Teor de taninos em tinturas de guaco comerciais

Tintura	Aliquota (mL)	Diluição	Teor de taninos em % *
Empresa 1	5	2000	0,18
Empresa 2	5	1000	0,06
Empresa 5	5	500	0,01
Empresa 6	5	1000	0,07
Empresa 7	5	2500	0,34
Empresa 8	5	1000	0,10
Padrão	5	5000	0,44

* Média de três determinações com diferença <1%.

Cálculo:
$$\frac{C_p \times D \times 4,2 \times (A_1 - A_2)}{V \cdot A_3} \times 100$$

A_1 = absorbância sem pó de pele

A_2 = absorbância com pó de pele

A_3 = absorbância do padrão

V = alíquota

D = diluição

C_p = concentração do padrão

4,2 = constante para a determinação de taninos⁸³

Gráfico 5.5. – Representação do teor de taninos nas amostras comerciais de extratos fluidos(E) e extrato padrão, de acordo com a tabela 5.22.

Gráfico 5.6. – Representação do teor de taninos nas amostras comerciais de tintura(T) e tintura padrão, de acordo com a tabela 5.23.

Tabela 5.26.- Cromatograma das amostras de extrato fluido no sistema II.

E1	E2	E3	E4	E6	E7	E8	E9	Ep
Verde Amarel. + Rx=1	Verde Amarel. + Rx=1 Azul ++ Rx=0,78	Verde Amarel. + Rx=1	Verde Amarel. + Rx=1	Verde Amarel. ++++ Rx=1	Verde Amarel. ++++ Rx=1	Verde Amarel. ++++ Rx=1	Verde Amarel. +++ Rx=1	Verde Amarel. ++++ Rx=1
Azul Esverd. + Rx=0,25	Azul +++ Rx=0,25	-	-	Azul + Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25
Verde Amarel. + Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	- Marrom ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Ocre ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Ocre ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Ocre ++++ Rx=0	Verde Amarel. ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0

E (extratos fluidos), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 (nº das amostras), Ep (extrato fluido padrão). Intensidade da mancha: + (fraca), ++(regular), +++(intensa), ++++(muito intensa). O Rx foi calculado usando o padrão Cumarina, que apresentou mancha verde amarelada intensidade ++++ e Rf=0,35.

Tabela 5.27.- Cromatograma das amostras de tinturas no sistema II.

T1	T2	T5	T6	T7	T8	Tp
Verde Amarelada + Rx=1	Verde Amarelada + Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarela da ++++ Rx=1
-	Azul ++ Rx=0,78	-	-	-	-	-
Azul Esverdeado + Rx=0,25	Azul +++ Rx=0,25	-	Azul + Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25	Azul ++ Rx=0,25
Verde Amarelada + Rx=0,14	Verde Amarelada ++ Rx=0,14	Verde Amarelada ++++ Rx=0,14	Verde Amarelada ++++ Rx=0,14	Verde Amarelada ++++ Rx=0,14	Verde Amarelada ++++ Rx=0,14	Verde Amarela da ++++ Rx=0,14
Marrom ++++ Rx=0	Marrom ++++ Rx=0	Marrom ++++ Rx=0	Ocre ++++ Rx=0	Marrom ++++ Rx=0	Ocre ++++ Rx=0	Marrom ++++ Rx=0

T (tinturas), 1,2,5,6,7 e 8 (nº das amostras), Tp (tintura padrão). Intensidade da mancha: + (fraca), ++(regular), +++(intensa), ++++(muito intensa).O Rx foi calculado usando o padrão Cumarina, que apresentou mancha verde amarelada intensidade ++++ e Rf=0,35.

Figura 5.6 - Placa cromatográfica do sistema I - amostras do comércio: E (extrato fluido), T (tintura), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (nº de amostras), Ep (extrato fluido padrão), Tp (tintura padrão), s (estigmasterol), t (timol). Referentes as tabelas 5.24 e 5.25.

Figura 5.7 - Placa cromatográfica do sistema II - amostras do comércio: E (extrato fluido), T (tintura), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (nº de amostras), Ep (extrato fluido padrão), Tp (tintura padrão), C (cumarina). Referentes as tabelas 5.24 e 5.25.

5.5. Valores obtidos no estudo de estabilidade do extrato fluido e tintura de guaco padrões.

5.5.1. Determinação do pH das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura.

Tabela 5.28. – Valores de pH nas frações da tintura de guaco armazenadas em diferentes condições de temperaturas e analisadas nos intervalos regulares de tempo.

Tempo de armazenagem (dias)	Tintura à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	5,73	-	-	-
15	5,73	5,72	5,69	5,68
30	5,78	5,69	5,72	5,53
45	5,75	5,68	5,66	5,68
60	5,72	5,68	5,68	5,64
90	5,71	5,66	5,69	5,64
120	5,73	5,69	5,64	-
150	5,67	5,66	5,61	-
180	5,70	5,66	5,64	-
240	5,68	5,60	5,54	-
300	5,75	5,74	6,07	-
366	5,64	5,54	5,66	-
2 anos	5,70	5,60	5,50	-

Tabela 5.29. – Valores de pH nas frações do extrato fluido de guaco armazenadas em diferentes condições de temperaturas e analisadas nos intervalos regulares de tempo.

Tempo de armazenagem (dias)	Extrato fluido à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	5,72	-	-	-
15	5,56	5,51	5,53	5,53
30	5,57	5,58	5,70	5,52
45	5,55	5,51	5,51	5,48
60	5,56	5,52	5,53	5,48
90	5,53	5,51	5,53	5,31
120	5,55	5,55	5,56	-
150	5,56	5,58	5,55	-
180	5,54	5,47	5,54	-
240	5,45	5,51	5,51	-
300	5,58	5,56	5,01	-
366	5,46	5,49	5,51	-
2 anos	5,50	5,50	4,60	-

5.5.2. Determinação de resíduo seco das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura.

Tabela 5.30. – Porcentagem de resíduo seco nas frações da tintura de guaco armazenadas em diferentes condições de temperaturas e analisadas nos intervalos regulares de tempo.

Tempo de armazenagem (dias)	Tintura à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	3,80	-	-	-
15	3,91	3,84	3,74	3,61
30	3,95	3,92	3,91	3,93
45	4,04	4,10	4,09	4,04
60	3,92	3,87	3,88	3,87
90	3,86	3,96	3,95	3,92
120	3,94	3,92	3,94	-
150	4,00	3,95	3,96	-
180	3,99	3,94	3,86	-
240	4,03	3,96	4,01	-
300	4,05	3,99	3,97	-
366	3,97	4,05	3,87	-
2 anos	3,82	3,84	3,81	-

Tabela 5.31. – Porcentagem de resíduo seco nas frações do extrato fluido de guaco armazenadas em diferentes condições de temperaturas e analisadas nos intervalos regulares de tempo.

Tempo de armazenagem (dias)	Extrato fluido à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	11,41	-	-	-
15	10,40	10,62	9,68	9,68
30	11,18	10,71	9,74	10,04
45	10,31	10,65	10,4	11,54
60	9,93	10,55	9,84	11,28
90	10,0	10,56	9,65	11,47
120	9,95	10,81	9,63	-
150	10,06	9,21	9,71	-
180	10,22	10,64	9,82	-
240	10,15	11,79	9,80	-
300	10,09	11,17	9,78	-
366	10,26	10,59	9,92	-
2 anos	10,54	11,61	26,80	-

5.5.3. Valores do teor de cumarina das frações armazenadas em diferentes condições de temperaturas.

Tabela 5.32. – Valores do teor de cumarina em mg/mL nas frações da tintura de guaco armazenadas em diferentes condições de temperaturas e analisadas nos intervalos regulares de tempo.

Tempo de armazenagem (dias)	Tintura à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	1,34	-	-	-
15	1,29	1,30	1,30	1,30
30	1,20	1,25	1,33	1,38
45	1,25	1,26	1,26	1,28
60	1,28	1,32	1,32	1,38
90	1,25	1,32	1,31	1,34
120	1,24	1,26	1,24	-
150	1,28	1,32	1,25	-
180	1,43	1,45	1,46	-
240	1,26	1,25	1,25	-
300	1,33	1,25	1,35	-
366	1,31	1,30	1,24	-
2 anos	1,31	1,31	1,30	-

Tabela 5.33. – Valores do teor de cumarina em mg/mL nas frações do extrato fluido de guaco armazenadas em diferentes condições de temperatura e analisadas nos intervalos regulares de tempo

Tempo de armazenagem (dias)	Extrato fluido à temperatura			
	Ambiente	40°C	45°C	60°C
0	3,50	-	-	-
15	2,90	2,92	2,63	2,91
30	3,12	2,85	2,63	2,97
45	2,93	2,83	2,86	3,43
60	2,85	3,02	2,96	3,85
90	2,83	2,96	2,77	3,70
120	2,80	2,8	2,81	3,80
150	2,85	2,93	2,80	-
180	3,26	3,83	3,25	-
240	3,06	3,21	2,87	-
300	2,88	3,33	3,00	-
366	2,92	2,89	2,99	-
2 anos	2,93	3,65	6,86	-

Gráfico 5.7. – Representação do teor de cumarina das frações da tintura armazenadas em temperaturas ambiente, 40°C e 45°C por intervalos de tempos segundo a tabela 5.32., a partir de 15 dias à dois anos.

Gráfico 5.8. – Representação do teor de cumarina das frações do extrato fluido armazenadas em temperaturas ambiente, 40°C e 45°C por intervalos de tempos segundo a tabela 5.33., a partir de 15 dias à dois anos.

5.5.4. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada das frações armazenadas em diferentes condições de temperatura.

Os cromatogramas se mantiveram constante durante o decorrer do tempos de análise até 2 anos. As tabelas de resultados apresentada se refere a análise de 365 dias.

Tabela 5.34.- Cromatograma das amostras de extrato fluido e tintura no sistema I, submetidas ao ensaio de estabilidade até 365 dias.

Ea	Ta	E40°C	T40°C	E45°C	T45°C
Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375	Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375	Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375	Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375	Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375	Lilás ++ Rx=2,25 Azul + Rx=1,375
Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0	Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0	Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0	Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0	Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0	Lilás ++ Rx=1,3 Violeta +++ Rx=1,125 Violeta ++ Rx=1 Violeta ++ Rx=0,92 Violeta ++ Rx=0,75 Violeta +++ Rx=0,68 Lilás ++ Rx=0,25 Lilás +++ Rx=0,22 Sépia ++++ Rx=0

Extrato (E), Tintura(T), temperaturas ambiente(a), 40°C e 45°C. Intensidade da mancha: + (fraca), ++(regular), +++(intensa), ++++(muito intensa).O Rx foi calculado usando o padrão Estigmasterol, que apresentou mancha violeta intensidade +++ e Rf=0,4.

Tabela 5.35. - Cromatograma das amostras de extrato fluido e tintura no sistema II, submetidas ao ensaio de estabilidade até 365 dias.

Ea	Ta	E40°C	T40°C	E45°C	T45°C
Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1	Verde Amarelada ++++ Rx=1
Azul ++ Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Azul ++ Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Azul ++ Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Azul + Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Ocre ++++ Rx=0	Azul ++ Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Marrom ++++ Rx=0	Azul ++ Rx=0,25 Verde Amarelada ++++ Rx=0,14 Ocre ++++ Rx=0

Extrato fluido (E), Tintura (T), temperaturas ambiente(a), 40°C e 45°C . Intensidade da mancha: + (fraca), ++(regular), +++(intensa), ++++(muito intensa).O Rx foi calculado usando o padrão Cumarina, que apresentou mancha verde amarelada intensidade ++++ e Rf=0,35.

5.6. Comparação dos métodos de preparação de extrato fluido.

Tabela 5.36. – Resultados comparativos dos extratos preparados pelo método A e C da Farmacopéia Brasileira 2ª ed.

	Extrato A	Extrato C
pH	6,20	6,23
Resíduo Seco*	12,06%	7,07%
Teor de Cumarina*	2,7 mg/mL	1,8 mg/mL
Teor de Taninos*	1,36%	2,30%

* Média de duas determinações, com diferença < 1%.

5.7. Valores obtidos no estudo da aplicação do método de determinação da cumarina por espectrofotometria derivada na primeira ordem para xarope de guaco (*Mikania glomerata* Spengel).

5.7.1. Varredura espectral da solução de xarope de guaco na derivada de primeira ordem.

Figura 5.8. Varredura espectral da solução do xarope de guaco padrão na derivada de primeira ordem.

5.7.2. Pesquisa de interferentes.

Figura 5.9. Varredura espectral da solução de xarope simples na derivada de primeira ordem.

Figura 5.10. Espectro da solução de xarope simples modificado na derivada de primeira ordem.

5.7.3. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco.

Tabela 5.37. Valores obtidos na determinação do teor de cumarina no xarope de guaco padrão pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem.

	Concentração em mg/mL
1	0,279
2	0,279
3	0,266
4	0,285
5	0,279

Cálculo utilizado para determinação da cumarina na amostra:

$$Ca_{(mg/mL)} = \frac{Aa \times Cp \times 125}{Ap \times Va}$$

Aa= absorbância da amostra

Ap= absorbância do padrão

Cp= concentração do padrão (mg/mL)

Ca= concentração encontrada na amostra

Va= volume da tomada de ensaio em mL

5.7.4. Resultados estatístico do método por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco.

Tabela 5.38 - Resultados estatísticos para doseamento da cumarina no xarope de guaco padrão pelo método as espectrofotometria derivada de primeira ordem .

	Xarope de guaco padrão (n=5)
Média (mg/mL)	0,277
Desvio médio	0,00464
Desvio padrão	0,0069
Variância	0,0000488
Desvio relativo	0,0249
Coefficiente de variação	2,49%

5.7.5. Valores obtidos do teste de recuperação do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco.

Tabela 5.39. Valores obtidos do teste de recuperação pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco padrão.

	% recuperação
I	100,00
II	97,33

Obs.: Os valores são médias de duas determinações com diferença <1%.

Cálculo:

$$\% = \frac{F - A}{P} \times 100$$

F = amostra adicionada de padrão com valor conhecido

A = amostra sem adicionar padrão

P = quantidade de padrão adicionada na amostra

5.7.6. Valores obtidos do teste de linearidade do método de determinação de cumarina por espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco.

Tabela 5.40. Valores do teste de linearidade pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem para xarope de guaco padrão.

Concentração de extrato fluido no xarope em %	Teor de cumarina em mg/mL
5	0,152
10	0,284
15	0,384
20	0,509

Obs.: Os valores são médias de duas determinações com diferença <1%.

Figura 5.11. Curva do teste de linearidade (tabela 5.40.) no xarope de guaco, em que se obteve $R^2=0,9923$ e $y=2,5053x$.

5.7.7. Valores obtidos na determinação do teor de cumarina em amostra comercial de xarope de guaco.

Tabela 5.41. Teor de cumarina pelo método da espectrofotometria derivada em amostra comercial de guaco.

Xarope de guaco	Teor de cumarina em mg/mL
Empresa 9 *	0,271
Xarope padrão **	0,277

Obs.: (*) Média de duas determinações, com diferença <1%, (**) Média de cinco determinações.

VI - DISCUSSÃO

O objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia aplicável ao controle de qualidade de extrato fluido e tintura de guaco. Partiu-se de um método oficial de doseamento de cumarina, para posterior comparação com método desenvolvido por espectrofotometria derivada.

O método da A.O.A.C. utilizado é empregado para determinação de cumarina em extrato de vanila. Nem sempre é possível utilizar o mesmo método em vários tipos de material vegetal porque a composição química das plantas é diferente e não se sabe quais interferências irão ocorrer.

No caso do extrato fluido de guaco, após aquecimento em banho-maria, a solução costuma algumas vezes apresentar turvação, fato que não é constante em todas as repetições da mesma amostra, embora se utilize procedimento idêntico. Isto ocorreu com mais frequência no extrato fluido do que na tintura, levando a resultados distorcidos.

O método da A.O.A.C. apresentou coeficiente de variação e desvio padrão muito alto, como mostra a tabela 5.1.3., não sendo possível dizer que é um método preciso e reprodutível para o extrato fluido e tintura de guaco.

O método desenvolvido por espectrofotometria derivada foi padronizado em bases experimentais. Os parâmetros delta lambda, velocidade de varredura e concentração analítica foram definidos experimentalmente.

A adição de acetato de chumbo 5% e posterior filtração é necessária para precipitação de taninos presentes no extrato fluido. Os taninos são compostos fenólicos que podem intervir no espectro da cumarina ²¹. Para certificar-se da

interferência dos taninos, foram feitas varreduras espectrais do extrato fluido e do padrão, com e sem acetato de chumbo. Notou-se que para o padrão, a adição de acetato de chumbo não alterou o espectro, já no extrato fluido houve alteração do pico máximo e a absorbância teve maior valor na amostra sem acetato de chumbo.

Na última diluição da análise testou-se como solventes: água, NaOH 0,1M e HCl 0,1M. A diluição com NaOH 0,1M teve completa modificação do espectro. Na diluição em água destilada obteve-se espectros parecidos com os diluídos em HCl 0,1M, porém, houve uma maior diferença na sobreposição dos picos do padrão e do extrato fluido. Optou-se por empregar HCl 0,1M por apresentar melhor definição dos picos.

Na varredura espectral na zero ordem há uma pequena variação do pico máximo de absorção entre a solução padrão de cumarina e do extrato fluido; o pico máximo da solução padrão ficou entre 277-278nm e no extrato fluido entre 273-275nm, indicando interferência na absorção de cumarina no extrato fluido, sendo necessário recorrer a espectrofotometria derivada.

Na espectrofotometria derivada a presença de interferentes é compensada pela leitura da diferença de absorbância em um comprimento de onda definido, esta diferenciação não aumenta o conteúdo de informação do espectro direto, mas proporciona perfil mais característico e afina as bandas de absorção, permitindo isolar aquelas que estão parcialmente encobertas pôr fazerem parte de um espectro largo e indiferenciado. No espectro de primeira ordem, o pico máximo se anula, os valores são negativos onde a absorção decresce e positivo onde a absorção aumenta. O sinal obtido é proporcional à concentração. O máximo e o mínimo do espectro da derivada correspondem aos pontos de inflexão da curva do espectro normal^{32, 37, 43}.

O pico máximo no espectro de primeira ordem para o extrato fluido e o padrão foi de 290nm, mas a leitura foi estabelecida em 320nm. Este comprimento de onda foi definido pelo estudo de interferências dos componentes do extrato

fluido de guaco, empregando-se cromatografia preparativa, da seguinte forma: Adicionou-se 1mL de acetato de chumbo a 2mL de extrato fluido, filtrou-se, e o filtrado foi aplicado em linha na placa cromatográfica preparativa paralelamente ao padrão de cumarina. As dez faixas resultantes foram separadas e diluídas em 10mL de álcool/água 2:1 (veículo utilizado na preparação do extrato fluido). Foram feitas varreduras espectrais individuais de cada faixa resultante e sobrepostas na primeira ordem (Anexo 1), juntamente com a varredura espectral do padrão de cumarina. A faixa que na placa cromatográfica se identificava com o padrão teve coincidência entre seus espectros. Em 320nm apresentou leitura somente para faixa que corresponde ao padrão e neste ponto os espectros das demais faixas se anulam. O pico da cumarina localiza-se em 290nm, mas neste comprimento de onda há uma outra faixa que apresenta absorção, embora em intensidade menor. Portanto, o método escolhido para determinar a concentração foi o método *zero-crossing*, no qual o valor absoluto da absorbância é medido a partir da linha da abcissa do eixo de anulação e onde as outras substâncias se anulam⁵⁴. O resultado da concentração do extrato fluido na leitura no λ em 290nm foi verificado e notou-se que a concentração calculada é mais alta e mais próxima do método da A.O.A.C., o que leva a concluir que o doseamento da cumarina pelo método da A.O.A.C. sofre interferência de outras substâncias presentes no extrato fluido do guaco.

Os resultados estatísticos obtidos para o método proposto da espectrofotometria derivada indicam^{4,12, 36}:

- precisão por apresentar desvio padrão relativo < 1%.
- exatidão por apresentar teste de recuperação em torno de 102%
- reprodutibilidade pelo valor de desvio padrão obtido.
- o coeficiente de linearidade da reta de calibração foi de 0,9951, indicando que o método é linear quando aplicado à substância pura.

Os métodos usuais descritos na literatura para determinação de especificidade e linearidade aplicadas a substâncias incorporadas na forma farmacêutica são de difícil aplicação em extratos vegetais, uma vez que recorrem na preparação de um placebo e incorporação do princípio ativo em concentração determinada; isto é impossível para extratos vegetais porque nas plantas há uma mistura natural de compostos^{4, 36}.

Para o estudo de linearidade, testamos a correlação entre quantidade conhecida de padrão adicionado ao extrato fluido e a quantidade encontrada em análise. O coeficiente de correlação da reta encontrado foi de 0,9976 indicando que o método é linear para aplicação no extrato fluido^{4, 12}.

O método de espectrofotometria derivada foi testado em xarope de guaco, obtendo-se desvio padrão relativo menor que 1%, porcentagem de recuperação em torno de 98,6% e coeficiente de calibração da reta de 0,9923. Esses resultados indicam que o método também pode ser empregado ao xarope de guaco quando preparado de acordo com a Farmacopéia Brasileira 1ª ed.⁸⁰. O método também é viável se incorporado na fórmula nipagim como conservante, sendo que a varredura espectral deste não apresenta interferência na varredura espectral da solução padrão de cumarina.

Conclui-se que o método por espectrofotometria derivada é adequado para determinação de cumarina em extrato fluido, tintura e xarope de guaco por mostrar-se viável, exato e preciso. Por este motivo foi escolhido para avaliar o teor de cumarina nas amostras comerciais e para o estudo de estabilidade.

A finalidade de avaliar as amostras adquiridas no comércio é constatar a qualidade do que é vendido e consumido. As amostras foram confrontadas com extrato fluido e tintura elaborados com matéria-prima de procedência conhecida e identificada pela descrição da Farmacopéia Brasileira 1ª ed.⁸⁰. Foram

manipulados segundo a mesma referência e a estes denominamos extrato fluido e tintura padrões.

Ainda não há método oficial específico para determinação dos princípios ativos em extrato fluidos e tintura de guaco, embora constam na Farmacopéia Brasileira 1ªed ⁸⁰. Esta droga por estar inscrita em código oficial é isenta de registro. Este fato faz com que haja muitos laboratórios interessados no produto ¹⁰.

Foram escolhidos 9 empresas fabricantes de extrato fluido e tintura de guaco. Empresas codificadas como 1, 2, 3, 4 e 5 vendem o produto direto ao paciente como forma farmacêutica. As empresas codificadas como 6, 7 e 8 vendem o produto como insumo farmacêutico para laboratórios e farmácias de manipulação. A empresa 9 trata-se de um órgão publico que fabrica o extrato fluido sem finalidade comercial como um semi-elaborado na fabricação de xarope de guaco. Segundo a análise de apresentação do produto apresentada nas tabelas 5.15 e 5.16., podemos notar que não há um consenso quanto ao prazo de validade, sendo que algumas empresas constam validade de 4 e 5 anos e outras 2 anos.

Somente as empresas 3, 5, 6, 7, 8 e 9 especificaram o nome científico da planta. Para o produto fitoterápico é imprescindível o nome científico da planta, uma vez que o mesmo nome popular pode designar mais de uma espécie vegetal. No caso do guaco há espécies de *eupatorium* e outras *mikantias* com o mesmo nome popular, porém, a espécie oficial e que é isenta de registro é a *Mikania glomerata* Sprengel. As demais informações observadas no rótulo são obrigatórias para venda de qualquer medicamento e necessárias para o consumidor ter segurança na compra do produto ¹⁰.

Para avaliação da qualidade das amostras foram realizados os seguintes testes: medidas de pH, medidas de densidade, teor de resíduo seco,

cromatografia em camada delgada, teor de cumarinas e de taninos. Podemos ainda destacar as características organolépticas dos produtos. Segundo o trabalho de Virgílio Lucas ⁴⁴, as características do extrato fluido são: “líquido de cor pardo esverdeado, odor e sabor aromático particular um pouco amargo, agradável, densidade 1,005g/mL e resíduo seco 20,4%”. Para tintura, Virgílio Lucas ⁴⁴ descreve: “cor-parda esverdeada, odor aromático próprio, sabor ardente, aspecto límpido, densidade 0,86q/mL e resíduo seco 2,40%”. Em todas as amostras e no padrão notou-se aspecto límpido, cor parda esverdeada, com diferenças de tons. Todas as amostras e padrão apresentam sabor amargo e odor característico, com exceção das amostras 1 a 4.

A densidade do padrão é diferente do que cita Virgílio Lucas, as faixas encontradas variam 0,91-0,98q/mL para extrato fluido e 0,88-0,96g/mL para tintura.

No resíduo seco do padrão e amostras estudadas houve grande variação de valores. O padrão apresentou resíduo seco bem mais alto, isto pode indicar que nas amostras a proporção planta líquido extrator não foi respeitada.

Para avaliação do teor de cumarina foi necessário ajustar a diluição de cada amostra para que os valores de leitura estejam dentro do ideal, ou seja, valores de leitura entre 0,07 a 0,01. Na literatura não consta qual o valor mínimo necessário para que o extrato fluido ou tintura tenha ação terapêutica. De acordo com os gráficos 5.3 e 5.4, visualizamos a grande discrepância entre os valores encontrados na amostras em relação ao padrão. As amostras das empresas 1, 2, 3, 4 e 8 apresentaram valores bem mais baixos em relação às demais amostras. Nas amostras das empresas 3 e 4 não foram possíveis de dosear a cumarina, mas podemos ver pelo espectro que possivelmente havia somente traços da cumarina, o que torna esses extratos fluidos inaceitáveis, apesar de serem vendidos sem restrições.

Na cromatografia em camada delgada, a placa cromatográfica do sistema I, segundo as tabelas 5.24 e 5.25, os extrato fluidos das empresas 6 e 7 e tinturas das empresas 5, 6 e 7 coincidem com extrato fluido e tintura padrão, embora com menor intensidade das manchas, o que pode ser explicado pela diferença também no resíduo seco que é mais baixo que no extrato fluido e tintura padrão; isto confirma que as amostras das empresas apresentam-se mais diluídas. Extrato fluidos das empresas 1,2,3,4 e 8 e tinturas 1,2 e 8 foram aplicados em concentração maior que as outras amostras, porém, apresentaram somente as primeiras manchas coincidentes e rastros, indicando que essas amostras estão muito mais diluídas que as outras.

A placa cromatográfica do sistema II, segundo tabelas 5.26 e 5.27, mostrou que todas as amostras apresentaram cumarina. As manchas obtidas dos extratos fluidos 6, 7 e 8 e tinturas 5, 6, 7 e 8 coincidiram com extrato fluido e tintura padrão com intensidade próxima. Extrato fluidos 1, 3 e 4 e tintura 1 apresentaram as manchas muito fracas. Extrato fluido e tintura 2 apresentaram manchas intensas mas que diferem do padrão e a mancha que corresponde à cumarina aparece muito fraca, isto pode indicar que a planta utilizada não seja *Mikania glomerata* Sprengel.

O teor de taninos foi analisado pelo método espectrofotométrico da Farmacopéia Européia 2^a ed., antes de analisar as amostras adquiridas no comércio testamos o método no extrato fluido e tintura padrão.

Taninos formam um grupo de substâncias do reino vegetal quimicamente compostas por uma mistura complexa de polifenóis de difícil separação que são definidos por um conjunto de propriedades. A propriedade dos taninos que mais se destaca é a capacidade de, em solução aquosa, precipitar proteínas. Esta propriedade em tecidos vivos é conhecida como ação “adstringente”, constituindo a base de sua aplicação terapêutica; em que lhe confere ação anti-séptica, homeostática e cicatrizante^{21, 85}.

O método utilizado para o doseamento dos taninos se baseia na propriedade destes em precipitar proteínas, onde se retiram duas alíquotas da mesma amostra. Na primeira é adicionado ácido fosfotúngstico que reage com todos os componentes redutores (hidroxilas fenólicas) pela redução do ácido fosfotúngstico a azul de tungstênio e na segunda alíquota adiciona pó de pele que precipita os taninos, em seguida filtra-se e também se adiciona ácido fosfotúngstico que reage com os componentes redutores que não são taninos. Com diferença de absorção medida entre a primeira e a segunda alíquota calcula-se a porcentagem de taninos expressa em pirogalol. Neste método foi também necessário ajustar o volume de alíquota e diluição, para se obter valores ideais de leitura⁵⁹.

Como era esperado, o teor de taninos no extrato fluido e tintura padrões foi maior do que encontrado nas amostras do comércio. Porém, amostras das empresas 1 e 2 apresentaram maior teor de taninos e baixo teor de cumarina em relação as outras amostras.

Quanto ao estudo de estabilidade, o objetivo foi determinar o tempo em que o extrato fluido e tintura permanecem sem alterações. A estabilidade de um produto medicinal é definida como a capacidade deste produto em manter suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas em determinadas condições de acondicionamento. O período durante o qual um determinado medicamento pode considerar-se estável designa-se por prazo de validade. Por outro lado, em geral, considera-se que uma preparação farmacêutica mantém sua estabilidade, desde que a perda do teor de seus princípios ativos não exceda 10% ou 15%, conforme o caso considerado^{56,74,86}.

A resolução-RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos determina no item 2.2.5. "Apresentar testes de estabilidade do medicamento acabado, em seu material de acondicionamento original, em três lotes consecutivos, em forma de tabela, informando as

condições de temperatura e umidade empregadas, e as características físico-químicas de acordo com a forma farmacêutica apresentada”¹⁰.

A estabilidade em produtos fitoterápicos é de difícil determinação, uma vez que as plantas têm constituição complexa com substâncias químicas que podem variar de acordo com a colheita e procedência. Detectar a degradação de cada componente torna-se tarefa complicada. Na literatura não foi encontrado trabalho específico sobre o assunto, sendo assim, os parâmetros para o estudo de estabilidade foram as alterações do perfil cromatográfico, pH, o teor de cumarina e resíduo seco.

Escolhemos a temperatura de 40°C e 45°C para estudo de estabilidade acelerada e 60°C por 90 dias para estudo de estabilidade limite.

O álcool contido no extrato fluido e tintura mantidos acima de 40°C evapora com o tempo, concentrando e aumentando o teor de resíduo seco e cumarina. A 60°C por 90 dias, ocorreu aumento do teor de resíduo seco e de cumarina devido à evaporação do álcool, o que não foi considerada uma degradação. A única modificação notada nesta temperatura foi uma pequena variação da cor. Nas temperaturas ambiente, 40°C e 45°C não foram observadas alterações em um ano de avaliação. Avaliados depois de 2 anos, a única alteração foi que o extrato fluido à 45°C aumentou o teor de cumarina e resíduo seco, o que se supõe ser devido a evaporação do álcool contido no líquido extrator, não sendo considerado uma degradação.

Com os valores obtidos no estudo de estabilidade não foi possível realizar cálculos de estabilidade, porém, pode-se garantir um prazo de validade mínimo por dois anos.

Testes de estabilidade feitos em tinturas de *Anthoxanthum odoratum*, *Lavandula officinalis*, *Cinnamomum cassia*, *Dipteryx odorata*, *Melilotus officinalis* e *Asperula odorata* não foram constatadas mudanças de teor de cumarina por 2 anos de estocagem. O que permite deduzir que a cumarina é um composto estável³⁵.

Foi preparado extrato fluido pelo método C da Farmacopéia Brasileira 2ªed. e comparado com o preparado pelo método A. O método C dispensa aquecimento para a concentração do extrato fluido, portanto, é mais indicado para plantas que contém princípio ativo volátil ou instável. A cumarina é um composto sublimável, que poderia se perder com aquecimento. Porém ao testar os dois métodos, verificou-se que o método C não apresentou vantagem sobre o método A ²⁰.

VII – CONCLUSÕES

- 6.1. O método oficial da A.O.A.C. não é adequado para determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel).
- 6.2. O método proposto por espectrofotometria na derivada de primeira ordem é viável para determinação de cumarina no extrato fluido e tintura de guaco. Este método apresenta especificidade, exatidão, precisão, linearidade e de fácil execução.
- 6.3. O método de espectrofotometria na derivada de primeira ordem também é viável para determinação de cumarina em xarope de guaco preparado segundo a Farmacopéia Brasileira 1ª ed.
- 6.4. Pelo método proposto pela Farmacopéia Européia 2ª ed. é possível determinar quantitativamente o tanino no extrato fluido e tintura de guaco.
- 6.5. Considerando a variação das amostras adquiridas no mercado conclui-se que não existe padronização do extrato fluido e tintura de guaco. É necessário que exista por parte dos laboratórios um controle de qualidade efetivo.
- 6.6. Pode-se prever que extrato fluido e tintura têm validade mínima de dois anos.

VIII- Anexo I

Varreduras espectrais das soluções extraídas faixas obtidas na placa preparativa de cromatografia em camada delgada, utilizando com fase estacionaria sílica gel e fase móvel heptano/acetona (10:3), desenvolvimento duplo.

Figura A.1 - Varreduras espectrais das soluções obtidas das extrações das faixas resultantes da placa de cromatografia em camada delgada.

Faixa 7

Faixa 2

Figura A.2 - Varreduras espectrais das faixas que apresentaram leitura, Faixa 7 corresponde ao padrão de cumarina, A-leitura em 290 e B-leitura em 320

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABOY, A.L.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; LANGELOH, A.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 165-172, 2000.
2. API, A.M. Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in vivo mouse micronucleous assay. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.39, n.8, p. 837-841, 2001.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (US). **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington: AOAC, 1965. p.287-288.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST INTERNATIONAL. **Peer-verified methods topic specific guidelines**. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.2-34.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.2, pt.1, n. 28, p.15-16
6. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.2, pt.1, n.36, p.4-5
7. BAHIA. Secretaria de Planejamento, Ciência e Tecnologia. Sub Secretaria de Ciência e Tecnologia. **Inventário de plantas medicinais do estado da Bahia**. Salvador: s.n., 1979. 1201p.
8. BIGHETTI, A.E., ANTÔNIO, M.A., KOHN, L.K., ALVES, A., REHDER, V.L.G., CARVALHO, J.E. Atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações obtidas da *Mikania glomerata* Sprengel. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, Recife, 2000. **Livro de Resumos**. Recife: s.n., 2000. p.216-217, Res. FM047.
9. BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n.6, de 31 de jan. 1995. **Diário de Oficial da União**, Brasília, n.26, 6 de fev. 1995. Seção 1. p.1523-1524. [Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária].
10. BRASIL, Leis, Decretos, etc. Resolução-RDC n.17, de 24 de fev. 2000.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

Diário Oficial da União, Brasília, n.40, 25 de fev. 2000. Seção 1 [Online] Disponível em: Acesso em: 20 mar. 2000. [Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos].

11. BRITISH Herbal Pharmacopeia 5.ed. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1995. p.217.
12. BRITTAIN, H. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.2, p.4-9, 1998.
13. CABRAL, L.M.; SANTOS T.C.; ALHAIQUE, F. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one from *Mikania glomerata*. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v.27, n.1, p. 103-106, 2001.
14. CAPPELARO, E., VILEGAS, J.H.V., LANÇAS, F. Análise por HRGS-MS do óleo essencial de *Mikania glomerata*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, Recife, 2000. **Livro de Resumos**. Recife: s.n., 2000. p.131-132, Res. QU032.
15. CASTEELE, K.V., GEIGER, H., SUMERE, C.F.V. Separation of phenolics and coumarins by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.258, p.111-124, 1983.
16. CHEN, C.T., SHEU, S.J. Separation of coumarins by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.A710, p.323-329, 1995.
17. CHOUCI, D., BARTH, D. Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated citrus peel oil by gas chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.A672, p.177-183, 1994.
18. COIMBRA, R. **Manual de fitoterapia** 2.ed. Belém: CEJUP, 1994. p.96, 155
19. COSTA, A.F. **Farmacognosia** 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v.3, p.738-739.
20. COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. v.2, p.189-193, 1025-1026.
21. COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v.1, p.908-930.
22. CZYGAN, F.C., FRÖHNE, D., HÖLTZEL, C., NAGELL, A., PFÄNDER, H.J., WILLUH, G., BUFF, W. **Herbal drugs and phytopharmaceutical**. London: CRC Press, 1994. p.67-69, 326-328.
23. DI STASI, L.C., HIRUMA, C.A., SANTOS, C.M., GUIMARÃES, E.M.

Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu-SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, Fortaleza, 1994, **Livro de Resumos**. Fortaleza: CNPq, 1994. Res. 320.

24. **DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas**. 25.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1996/1997. 962p.
25. DOMÍNGUEZ, X.A. **Métodos de investigación fitoquímica**. México: Editorial Limusa, 1973. p.111-115.
26. EDWARDS, A.J.; PRICE, R.J.; RENWICK, A.B.; LAKE, B.G. Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat hepatocyte DNA repair assay. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.38, n.5 p. 403-409, 2000.
27. **EUROPEAN Pharmacopoeia** 2.ed Sainte-Ruffine: Maisonneuve, 1980-. pt.2, p.289-293. (European treaty series, n.50)
28. **FARMACOPÉIA Brasileira**. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p. 914, 933.
29. **FARMACOPÉIA Brasileira**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pt. 2 p.30-32.
30. **FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.446-451, 829-830.
31. FIERRO, I.M., SILVA, A.C.B., LOPES, C.S., MOURA, R.S., FIDALGO, C.B. Studies on the anti-allergic activity of Mikania glomerata. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v.66, n.1, p.19-24, 1999.
32. FOMPEYDIE, D., LEVILLAIN, P. Dosagem de léosine et de l'ethiliosine en melange par spectrophotometric derivée. **Analusis**, Les Ulis, v.13, p.181-184, 1985.
33. GANZERA, M., STURN, S., STUPPNER, H. HPLC-MS and MECC Analysis of coumarins. *Chromatogr.*, New York, v.46, n.3/4, p.197-203, 1997.
34. GIBBS, R.D. **Chemotaxonomy of flowering plants**. London: McGill Queen's University Press, 1974. v.1, p.142-144.
35. GRACZA, L. Zur standardisierung und haltbarkeit curmarin-haltiger tinkturen. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, Stuttgart, v.117, n.45, p.1865-1868, 1977.
36. GREEN, J.M. A pratical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, Columbus, v.68, n.9, p.305A-309A, 1996.
37. HACKMANN, E.R.M., BENETTON, S.A., SANTORO, M.I.R.M.

- Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa, v.41, p.1, p.7-13, 1991.
38. HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984. p.48-51.
 39. HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simples coumarins: natural products with therapeutic potencial. **General Pharm.**, Elmsford, v.27, n.4, p.713-722, 1996.
 40. JONCZYK, A., WILCZYNSKA, I.W. Determination of cinametic, cinnmic acid and coumarin by chromatography (HPLC) and spectrophotometric methods in pharmaceutical preparations. **Chem. Anal.**, Columbus, v.33, n.4, p.535-543, 1988.
 41. LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.37, n.4, p.423-453, 1999.
 42. LEITE, M.G.R., SOUZA, C.L., SILVA, M.A.M., MOREIRA, L.K.A., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.74, n.1, p.12-15, 1993.
 43. LEVILLAIN, P., FOMPEYDIE, D. Spectropotometrie dérivée: intérêt, limites et appications. **Analusis**, Les Ulis, v.14, n.1, p.1-20, 1986.
 44. LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. **Rev. Flora Med.**, Rio de Janeiro, v.9, n.3, p.101-132, 1942.
 45. MALIKOV, V.M.; SAIDKHOZHAEV, A.I. Coumarins: plants, structure and properties. **Chem. Nat. Compd.**, New York, v.34, n.2, p.202-264, 1998.
 46. MARQUES, L.C. Aspectos legais dos fitoterápicos. **Fármacos e medicamentos**, São Paulo, n.7, p.32-39, 2000.
 47. MARTELLI, A., CALVINO, R. Riconoscimento e dosemento della cumarina nelle droghe, tinture e alcolati mediante cromatografia in strato sotille. **Farmaco, Ed. Prat.**, Pavia, v.26, n.1, p.67-72, 1971.
 48. MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. 3.ed. Fortaleza: U.F.C., 1998. p.120-122.
 49. MAZZA, G. Determination of coumarin in flavoured alcoholic beverages by high-pressure liquid chromatography. **Riv. Vitic. Enol.**, v.37, n.6, p.316-323, 1984.
 50. MERCK Index. 12.ed. Rahway: Merck, 1996. p.434.

51. MING, L.C., CORRÊA, J., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.99-100.
52. MORAES, M.D. A família *asteraceae* na planície litorânea de Picinguaba, município de Ubatuba - São Paulo. Campinas, 1997. s.p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia - UNICAMP).
53. MORETO, L.D., ZERINGOTO, H.F.C., MARQUES, L.C. Contribuição do sub-grupo de fitoterápicos do SINDUSFARM-SP à estruturação da fitoterapia no Brasil – SINDUSFARM – São Paulo.
54. MORRELLI, B. “Zero-crossing” derivative spectrophotometric determination of mixture of cephalixin sodium and cefuroxime sodium in pure form and in injections. **Analyst**, Amsterdam, v.113, p.1077-1082, 1988.
55. MOURA, S.R., NASCIMENTO, V., MAGALHÃES, V.C., GAGLIARDI, A.R.F., COSTA, S. Efeitos de algumas frações obtidas de extrato hidroalcoólico e de éter de petróleo de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel na traquéia isolada de cobaio. In: REUNÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 5, 1990. **Livro de resumos**. Caxambu: FESBE, 1990.
56. MUTHE, A.V., KELKAR, M.R. Stability of pharmaceuticals: an overview **East. Pharm.**, New Delhi, Setember, v.30, p.43-44, 1987.
57. NAKASHIMA, T., KRESPY, P.B. Avaliação ao controle da qualidade de guaco, *Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPN, 8, Curitiba, 2000. **Anais**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nisseis, 2000. p93-94. Res.98.
58. OHKOSKI, E., MAKINA, M. Studies the constituents of *Mikania hirsutissima*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.47, n.10, p.1436-1438, 1999.
59. OHLWEILLER, O.A. **Química analítica quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, p.679-681.
60. OLIVEIRA, F. Biofarmacognosia das espécies brasileiras da secção *Globosae* Robinson do gênero *Mikania* Willdenow., São Paulo, 1983. 249p. (Tese de Livre Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).
61. OLIVEIRA, F., AKISUE, A. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991. p.80-81
62. OLIVEIRA, F., AKISUE, A. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989. p.149.

63. OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K., JORGE, L.I.F. Morfodiagnose de folhas e das partes reprodutivas de *Mikania leviagata* Schultz Bip ex Baker. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.1, n.1, p.20-34, 1986.
64. OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K., JORGE, L.I.F. Morfodiagnose de de *Mikania leviagata* Schultz Bip ex Baker: estudo do axófito. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.1, n.1, p.45-57, 1986.
65. OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K., MANCINI, B., CHUMZUM, M. Morfodiagnose do guaco *Mikania glomerata* Sprengel Compositae. **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v.7, p.17-26, 1985.
66. OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K., MANCINI, B., CHUMZUM, M. Morfodiagnose do axófito guaco *Mikania glomerata* Sprengel Comp. **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v.8/9, p.11-24, 1986/1987.
67. OLIVEIRA, F., ALVARENGA, M.A., AKISUE, G., AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.20, n.2, p.169-183, 1984.
68. OLIVEIRA, F., OGA, S., AKISUE, G., AKISUE, M.K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker). **An. Farm. Quim.**, São Paulo, v.25, n.1/2, p.50-54, 1985.
69. OLIVEIRA, F., SAITO, M.I., GARCIA, L.O. Caracterização cromatografica em camada delgada do extrato fluido de guaco *Mikania glomerata* Sprengel. **Lecta, Univ. São Francisco**, Bragança Paulista, v.11, n.1, p.43-56, 1993.
70. ORLOV, V.E. Determination of coumarin in sweet clover herbage by polorographic method. **Chem. Nat. Compd.**, New York, v.24, n.3, p.118-119, 1988.
71. PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. São Paulo: IBRASA, 1997. p.117-118.
72. PEREIRA, N.A., PEREIRA, B.M.R., NASCIMENTO, M.C., PARENTE, J.P., MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. IV. Proction against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.**, Stuttgart, v.60, p.99-100, 1994.
73. PIO CORREIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1952. v.3, p.517-520.

74. PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1983. v.2, p.187-197. 230-235.
75. QUER, P.F. **Plantas medicinales**. 5.ed. Barcelona: Ed. Labor, 1979. p.490.
76. RUPPELT, B.M., PEREIRA, E.F.R., GONÇAVES, L.G., PEREIRA, A.N. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.203-205, 1991.
77. SALLÉ, J.L. **O totem da fitoterapia**. São Paulo: Editorial Robe, 1996. p.174.
78. SANTOS, T.C. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Mikania glomerata* Sprengel. Rio de Janeiro, 1995. s.p. (Dissertação de Mestrado - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais - UFRJ).
79. SHIGIBUSAWA, Y., HAGIWARA, Y., CHAO, Z., MA, Y., ITO, Y. Application of high-speed counter-current chromatography to the separation of coumarin and related compounds. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.A759, p.47-53, 1997.
80. SILVA, R. A. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Ed. Nacional, 1929. p.384-387, 425, 495, 893-894, 929.
81. SIQUEIRA, J.M., PALHANO, P.C., SAUER, L., CASTRO, M.S. Levantamento de plantas medicinais utilizadas na sede do município de Amambai-MG In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, Fortaleza, 1994, **Livro de Resumos**. Fortaleza: CNPq, 1994. Res.004.
82. SOINE, T.O. Naturally occurring coumarins and related physiological activities. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.53, n.3, p.231-264, 1964.
83. STAHL, E., SCHILD, W. **Pharmazeutische biologie 4. Drogenanalyse 11. Inhaltsstoffe und Isolierungen**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1981. p.305. Apud: Silva, V.R. L. Determinação de taninos em extratos vegetais, São Paulo: 1998. 85 p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP).
84. TESKE, M., TRERENTINI, A.M.M. **Herbarium compêdio de fitoterapia** 3.ed. Curitiba: Ed. Herbarium, 1995. p.160-161.
85. TYLER, V., SPEEDIE, M.K., ROBBERS, J.E. **Farmacognosia e biotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p.153-160.
86. **UNITED States Pharmacopeia** 23.ed. Rockville: Board of Trustees, 1995. p.1959-1963.

87. VENEZIANI, R.C.S., CAMILO, D., OLIVEIRA, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v.27, n.1, p.99-102, 1999.
88. VILEGAS, J.H.Y., MARCHI, E., LANÇAS, F.M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('guaco') leaves by capillary gas chromatography. **Phytochem. Anal.**, Chichester, v.8, p.74-77, 1997.
89. VILEGAS, J.H.Y., MARCHI, E., LANÇAS, F.M. Extration of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and Kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. **Phytochem. Anal.**, Chichester v.8, p.266-270, 1997.
90. WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag 1984. 320p.
91. WORLD Health Organization. **Good manufacturing for pharmaceutical products: supplementary guidelines for the manufacture of herbal medicinal products**. Geneva: Who/ Pharm/93.561, 1993. 5p.
92. WORLD Health Organization. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization, 1999. v.1.
93. WORLD Health Organization. **Quality control methods for medicinal plants material**. Geneva: Who/ Pharm/92.559, 1992. 84p.
94. ZANINE, A.C., BASILE, A.C., FOLLADOR, M.J., FOLLADOR, W. **Miniguia de produtos farmacêuticos**. São Roque: Ipex, 1996. 238p.
95. ZHANG, X., XU, L. Polarographic determination of active principles in Bai Zhi (*Angelica daurica* roots). **Yaowu Fenxi Zazhi.**, Beijing, v.3, n.4, p.218-221, 1983.