

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Boldina em  
*Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e Avaliação Preliminar de sua Estabilidade.

MELISSA SCHWANZ

PORTO ALEGRE, 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e Avaliação Preliminar de sua Estabilidade.

Dissertação apresentada por **Melissa Schwanz** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24 de abril de 2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice A. Machado

Pontifícia Universidade Católica

Prof. Dr. Eduardo Augusto Moreira

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S398d Schwanz, Melissa

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade / Melissa Schwanz – Porto Alegre: UFRGS, 2006. – 123p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Peumus boldus*. 2. Monimiaceae. 3. Validação; métodos analíticos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência 5. Estabilidade. 6. Botânica I. Henriques, Amélia T. II. Título.

CDU: 615.322

Bibliotecária responsável

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

Este trabalho foi subvencionado pelo CNPq e desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia e Fitoquímica, de Química Farmacêutica, de Controle de Qualidade e de Botânica da Faculdade de Farmácia desta Faculdade, e contou com a colaboração dos Professores Dr. Pedro Eduardo Fröhlich, Dra. Lilian Auler Mentz e Msc. Eliana Nunes.

Agradecemos aos professores citados pela colaboração.

*“Tudo tem seu tempo, até certas  
manifestações mais vigorosas e originais  
entram em voga ou saem de moda.  
Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna”.*

**BALTASAR GRACIÁN**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr<sup>a</sup>. Amélia T. Henriques por sua orientação, incentivo e respeito.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Lílian A. Mentz e Msc. Eliana Nunes, Msc. Giovana Vendruscolo e Msc. Márcia Vignoli, pelo apoio e pelo paciente e incansável trabalho botânico, e ao Professor Dr. Pedro E. Fröhlich e Jéferson José Ferreira, pela colaboração na realização desta dissertação.

Ao professor Dr. Eduardo A. Moreira, pelos ensinamentos na iniciação científica (URI), pelo apoio, credibilidade e incentivo ao ingresso no programa de pós-graduação desta universidade.

Aos companheiros e amigos do laboratório Ana Aboy, Ana Lúcia, Camila, Carolina, Cláudia, Dimas, Eduardo, Fabiane, Grazielle, Guilherme, Jean, Larissa, Letícia, Liana, Marcelo, Maria, Miriam, Nael, Paulo, Rafaela, Raquel, Renata, Roger, Rogério, Rosana, Simone, Tatiane, Tiago e Valquíria, especialmente à minha amiga, prestativa e companheira, Marina.

Às amigas e vizinhas Ana Cristina, Ana Paula, Carolina, Daniela Albring e Daniela Fritz, e ao Professor José Ângelo Zuanazzi.

À minha mais que amiga Miriane, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados, e pelo acolhimento.

Aos meus maiores incentivadores...

Meu pai, que nunca mediu esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Meu precioso irmão e amigo Thiago.

Meu amor Evandro, pela força, paciência e carinho dedicados.

E, especialmente à minha mãe, que me ensina o que livros não ensinam...

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
RESUMO .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. OBJETIVOS GERAIS.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 Aspectos botânicos.....	11
2.2 Aspectos farmacológicos e usos populares.....	15
2.2.1 Etnofarmacologia.....	15
2.2.2 Atividade antioxidante.....	17
2.2.3 Atividade antiinflamatória.....	19
2.2.4 Atividade fotoprotetora.....	19
2.2.5 Atividade antimicrobiana.....	20
2.2.6 Estudos toxicológicos.....	20
2.3 Aspectos químicos.....	20
3. ANÁLISE BOTÂNICA.....	25
3.1 Introdução.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	28
3.3 Materiais e métodos.....	28
3.3.1 Material vegetal.....	28
3.3.2 Análise macroscópica.....	29
3.3.3 Análise microscópica.....	29
3.3.4 Testes histoquímicos.....	29
3.4 Resultados e discussão.....	30
3.4.1 Descrição macroscópica.....	30
3.4.2 Descrição microscópica.....	31
3.4.3 Descrição microscópica do pó.....	35
4. ENSAIOS DE PUREZA E ANÁLISE QUANTITATIVA DA DROGA VEGETAL.....	49

4.1 Introdução.....	51
4.2 Objetivos específicos.....	54
4.3 Materiais e métodos.....	54
4.3.1 Material vegetal.....	54
4.3.2 Ensaio de pureza.....	55
4.3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais.....	55
4.3.2.2 Determinação da perda por dessecação.....	55
4.3.2.3 Determinação de materiais estranhos.....	55
4.3.3 Análise quantitativa.....	56
4.3.3.1 Preparação dos extratos.....	56
4.3.3.2 Análise cromatográfica.....	56
4.3.3.3 Condições cromatográficas.....	56
4.3.3.4 Curva padrão da boldina.....	57
4.3.4 Validação do método analítico.....	58
4.3.4.1 Especificidade.....	58
4.3.4.2 Linearidade.....	58
4.3.4.3 Precisão.....	58
4.3.4.4 Exatidão.....	59
4.3.4.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	59
4.3.4.6 Robustez.....	60
4.4 Resultados e discussão.....	60
4.4.1 Ensaio de pureza.....	60
4.4.1.1 Determinação do teor de cinzas totais.....	60
4.4.1.2 Determinação da perda por dessecação.....	61
4.4.1.3 Determinação de materiais estranhos.....	62
4.4.2 Análise quantitativa.....	63
4.4.2.1 Análise cromatográfica.....	63
4.4.3 Validação do método analítico.....	67
4.4.3.1 Especificidade.....	67
4.4.3.2 Linearidade.....	67
4.4.3.3 Precisão.....	68
4.4.3.4 Exatidão.....	69
4.4.3.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	70



4.4.3.6 Robustez.....	70
5. QUANTIFICAÇÃO DE BOLDINA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE <i>Peumus boldus</i> .....	71
5.1 Introdução.....	73
5.2 Objetivos específicos.....	75
5.3 Materiais e métodos.....	75
5.3.1 Material vegetal.....	75
5.3.2 Análise quantitativa.....	75
5.4 Resultados e discussão.....	75
6. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA.....	79
6.1 Introdução.....	81
6.2 Objetivos específicos.....	83
6.3 Materiais e métodos.....	83
6.3.1 Material vegetal.....	83
6.3.2 Condições do estudo.....	83
6.3.3 Análise quantitativa.....	84
6.3.4 Cálculos da velocidade de degradação (k), dos tempos de vida útil (t <sub>90%</sub> ) e meia vida(t <sub>1/2</sub> ).....	84
6.4 Resultados e discussão.....	84
7.QUANTIFICAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	91
7.1 Introdução.....	93
7.2 Objetivos específicos.....	97
7.3 Materiais e métodos.....	98
7.3.1 Material vegetal.....	98
7.3.2 Preparação das curvas padrão.....	98
7.3.3 Preparação das amostras.....	99
7.3.4 Preparação do branco.....	99
7.3.5 Quantificação por espectrofotometria de absorção atômica.....	99
7.4 Resultados e discussão.....	99
DISCUSSÃO GERAL.....	103
CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	113

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura química de alcalóides aporfínicos isolados de <i>Peumus boldus</i> .....	22
Figura 3.1 Ilustrações botânicas macro e microscópicas de folhas de <i>Peumus boldus</i> .....	41
Figura 3.2 Ilustrações botânicas microscópicas de folhas de <i>Peumus boldus</i> .....	43
Figura 3.3 Ilustrações botânicas microscópicas de folhas de <i>Peumus boldus</i> .....	45
Figura 3.4 Ilustrações botânicas microscópicas de folhas de <i>Peumus boldus</i> .....	47
Figura 4.1 Cromatograma de <i>Peumus boldus</i> a 305 nm de acordo com o método proposto e destacando a boldina com seu respectivo UV.....	64
Figura 4.2 Sobreposição dos cromatogramas obtidos com a solução extrativa de <i>Peumus boldus</i> com o cromatograma da substância de referência boldina.	64
Figura 4.3 Curva padrão da boldina obtida por CLAE.....	66
Figura 4.4 Cromatograma demonstrando a especificidade do método em relação à boldina.....	67
Figura 4.5 Curva de linearidade apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão da amostra de <i>Peumus boldus</i> .....	68
Figura 5.1 Análise do teor de boldina encontrada em amostras de <i>Peumus boldus</i> do Brasil, Chile e Argentina.....	76
Figura 6.1 Perfil do decaimento da concentração de boldina obtido a partir das análises cromatográficas das amostras provenientes do estudo de estabilidade acelerada de <i>Peumus boldus</i> .....	85
Figura 6.2 Cromatogramas obtidos na análise de estabilidade acelerada de <i>Peumus boldus</i> .....	87
Figura 6.3 Análise das áreas médias dos principais picos encontrados nos cromatogramas de <i>Peumus boldus</i> encontradas na análise de estabilidade acelerada.....	88
Figura 6.4 Representação gráfica, de segunda ordem, da curva de degradação da boldina.....	89
Figura 7.1 Comparação dos metais presentes em diferentes amostras de <i>Peumus boldus</i> .....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Análises cromatográficas em CCD relatadas para <i>Peumus boldus</i> .....	23
Tabela 2.2 Análises por CLAE relatadas para <i>Peumus boldus</i> .....	23
Tabela 3.1 Listagem das amostras industriais e comerciais de <i>Peumus boldus</i> utilizadas nas análises botânicas.....	28
Tabela 4.1 Listagem das amostras industriais e comerciais de <i>Peumus boldus</i> utilizadas nos ensaios de pureza.....	55
Tabela 4.2 Parâmetros definidos para a análise cromatográfica dos extratos da espécie <i>Peumus boldus</i> .....	57
Tabela 4.3 Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.....	60
Tabela 4.4 Teor de cinzas totais para amostras de <i>Peumus boldus</i> .....	61
Tabela 4.5 Teor de umidade de amostras de <i>Peumus boldus</i> .....	61
Tabela 4.6 Áreas absolutas dos picos de boldina obtidas por CLAE.....	66
Tabela 4.7 Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão da boldina.....	66
Tabela 4.8 Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade de <i>Peumus boldus</i> .....	68
Tabela 4.9 Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária de <i>Peumus boldus</i> .....	69
Tabela 4.10 Resultados da análise de exatidão para a amostra de <i>Peumus boldus</i> .....	69
Tabela 4.11 Avaliação do parâmetro de robustez por CLAE para <i>Peumus boldus</i> .....	70
Tabela 5.1 Listagem das amostras industriais e comerciais de <i>Peumus boldus</i> .....	75
Tabela 5.2 Teores médios de boldina encontrados nas amostras de <i>Peumus boldus</i> .....	76
Tabela 5.3 Médias das concentrações de boldina obtidas nos três países.....	77

Tabela 6.1 Análise de estabilidade acelerada de <i>Peumus boldus</i> .....	85
Tabela 6.2 Percentuais médios de degradação do teor de boldina no estudo de estabilidade acelerada de <i>Peumus boldus</i> .....	86
Tabela 6.3 Valores experimentais obtidos na análise de estabilidade acelerada de <i>Peumus boldus</i> , considerando-se diferentes ordens de reação.	89
Tabela 7.1 Listagem das amostras de <i>Peumus boldus</i> utilizadas na quantificação de metais pesados.....	98
Tabela 7.2 Concentrações das curvas padrão obtidas para cada metal pesquisado.....	98
Tabela 7.3 Concentrações médias de metais nas amostras de <i>Peumus boldus</i> .....	100

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 4.1 Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico.....	59
Equação 4.2 Cálculo para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	60
Equação 6.1 Equações de segunda ordem usadas no cálculo da velocidade de degradação (k), tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ).....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPP: 2,2' – azobis [2-amidinopropano]

ACN: acetonitrila.

CCD: cromatografia em camada delgada.

CE<sub>50</sub>: concentração suficiente para obter 50% de um efeito máximo estimado em 100%.

CG: Cromatografia Gasosa

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência.

CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

DP: desvio padrão.

DPPH: hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

DPR: desvio padrão relativo.

FDA: Administração de Fármacos e Alimentos, Estados Unidos.

k: constante de velocidade de reação.

PVDF: membrana filtrante em fluoreto de polivilideno.

T<sub>90%</sub>: valor em que a concentração da substância avaliada é 90% da concentração inicial.

T<sub>1/2</sub>: valor em que a concentração da substância avaliada é 50% da concentração inicial.

TBARS: substâncias reativas ao tiobarbitúrico

t-BOOH: butanol

TFA: ácido trifluoroacético.

UV/VIS: ultravioleta na região do visível.

## RESUMO

*Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) é uma árvore comum e abundante no Chile, e suas folhas são amplamente empregadas pela medicina tradicional para o tratamento de uma variedade de afecções do sistema digestivo e hepatobiliar. Seus principais constituintes químicos são alcalóides do tipo aporfínicos, sendo a boldina seu maior e mais característico representante, cujas propriedades antioxidantes são extensivamente relatadas na literatura, servindo desta forma como marcador químico para a espécie. Com o objetivo de contribuir com parâmetros de controle de qualidade, um estudo botânico macro e microscópico das folhas e do pó da espécie foi realizado. Características morfológicas, identificadas pela análise macroscópica, como pilosidade, tipologia dos tricomas, proeminência ao redor da base dos tricomas e aparência do bordo, e características microscópicas como estômatos anomocíticos, folha hipoestomática e ocorrência de cristais de oxalato de cálcio denotam valor taxonômico. Parâmetros farmacopéicos como cinzas totais e perda por dessecação foram determinados, e um método de quantificação da boldina foi desenvolvido e validado utilizando a CLAE. O limite mínimo de boldina observado na análise de 10 amostras adquiridas foi de aproximadamente 0,016%. A fim de avaliar-se o comportamento de seus constituintes químicos frente a variações de temperatura e umidade, realizou-se estudo de estabilidade acelerada ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{ U.R.}$ ). A degradação máxima de boldina foi observada após 90 dias em câmara climática chegando a aproximadamente 52%. A reação de degradação sugerida foi de segunda ordem, e o tempo de vida útil e meia-vida calculados foram de aproximadamente 18 dias e 165 dias, respectivamente. Por fim, realizou-se a quantificação de alguns metais pesados nas folhas da espécie, que decresceram na ordem de  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Ni}$ , sendo que Pb, Cr e Co tiveram níveis abaixo do limite de detecção de  $5 \mu\text{g/g}$ .

Palavras-chave: *Peumus boldus*, estudo botânico, CLAE, validação, estabilidade.

## ABSTRACT

*Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) is an abundant and widespread tree native from Chile, and the leaves are widely used in folk medicine for the treatment of digestive and hepatobiliary disorders. Its leaves are rich in several aporphine-like alkaloids such as boldine, the most characteristic one and used as a marker constituent for species. This compound has potent antioxidant properties described in literature. In order to contribute with quality control parameters, macro and microscopical analysis of the leaves and powder were carried out. Morphological characteristics of the macroscopical analysis like pilosity, trichomes type, trichome basis proeminency and border appearance; and microscopical characteristics like anomocytic stomata, hypostomatic leaf and the presence of calcium oxalate crystals denote taxonomic value. The following Pharmacopoeia parameters were also determined: total ash and loss on drying, and a method for boldine quantification were developed and validated using HPLC. The minimum limit of boldine observed in the analysis of 10 samples obtained had been of approximately 0,016%. In order to evaluate the behavior of its chemical constituents under temperature and moisture variations, a study of accelerated stability ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{ R.U.}$ ) was carried out. The maximum boldine degradation was observed after 90 days of treatment, reaching approximately 52%, and the kinetic degradation of second order was suggested, By this mean, the shelf life expectancy was determined to be 18 days and the half-life was 165 days. Finally, the quantification of heavy metals in the leaves of the specie was performed, and found in the descending order  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Ni}$ ; Pb, Cr and Co had their quantification levels lower than the detection limit of  $5 \mu\text{g/g}$ .

Key-words: *Peumus boldus*, botanical study, HPLC, validation, stability.







## INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas o interesse por plantas medicinais tem sido crescente em todo o mundo, principalmente depois de um período em que a química sintética trouxe grandes avanços no desenvolvimento de novos medicamentos. Durante a primeira metade do século XX, acreditava-se que tudo poderia ser sintetizado em laboratório, entretanto, as plantas, ainda hoje, continuam sendo fonte importante de substâncias farmacológicas ativas (GARCIA, 2000).

Por volta de 1990 (MONTANARI *et al.*, 2001), estimou-se que cerca de 80% da população mundial procuravam nas plantas a fonte principal de medicamentos. Esta utilização continua até os dias atuais. Fundamentada neste princípio, a indústria farmacêutica vem realizando grandes investimentos em pesquisas de bioprospeção. De 520 novos fármacos de várias classes, aprovados de 1983 a 1994 pelo FDA nos Estados Unidos, 30 eram produtos naturais e 173 eram estruturas semi-sintéticas com núcleos de produtos naturais, ou modeladas em um farmacóforo natural (CRAGG *et al.*, 1997).

Embora existam numerosos grupos de pesquisa em química e farmacologia de produtos naturais, os produtos fitofarmacêuticos existentes no mercado primam pela baixa qualidade e pela inexistência de dados que atestem, se não a eficácia terapêutica, mas, ao menos, a ausência de toxicidade. Em reunião de peritos da Organização para o Desenvolvimento Industrial das Nações Unidas – ONUDI, realizada em 1993 em Panajachel, Guatemala, apontou-se, entre outras, como causa para a baixa qualidade dos produtos fitoterápicos, a falta de conhecimentos tecnológicos para a sua fabricação, o desconhecimento ou inexistência de métodos e desenvolvimento em agrotecnologia, tecnologia farmacêutica, validação e a dificuldade de obtenção de plantas medicinais com a qualidade e em quantidades necessárias (SHARAPIN, 2000).

A segurança do uso destes produtos vem sendo questionada principalmente devido a relatos de doenças e fatalidades, algumas destas associadas à presença de metais tóxicos. A avaliação destes elementos em plantas medicinais tem atraído a atenção de cientistas nos últimos anos, pois os vegetais podem acumular estes metais em todos os tecidos, podendo transferí-los para a cadeia alimentar, e esta

acumulação é um dos maiores interesses ambientais no presente, não apenas pela fitotoxicidade de muitos destes metais, mas também pelos potenciais efeitos nocivos na saúde animal e humana (KAKOSY *et al.*, 1996; STEWART *et al.*, 1999; ERNST *et al.*, 2002; KANNAMKUMARATH *et al.*, 2004; MAIGA *et al.*, 2005).

Grande parte dos trabalhos realizados em plantas é direcionado para o isolamento de metabólitos secundários. Porém, estudos de parâmetros de qualidade e estabilidade de matérias-primas vegetais são raros, e ainda mais raros são os trabalhos destinados à quantificação de metais, que possuem papel importante na fisiologia dos vegetais, podendo interferir na produção de metabólitos secundários e na toxicidade do vegetal (PEREIRA *et al.*, 1998).

Assim, sabendo-se que um fator limitante para uma maior utilização pelas indústrias é que, a maioria das plantas em uso não possui parâmetros de qualidade definidos, o estabelecimento de métodos analíticos validados, que garantam a quantificação de marcadores químicos para o controle da matéria-prima vegetal e dos produtos de transformação, tanto intermediários quanto finais, é fundamental para a produção de fitoterápicos com qualidade. A análise botânica para verificação de possíveis adulterantes, estudos de estabilidade, visando à determinação do prazo de validade dos produtos desenvolvidos e a quantificação de metais pesados na matéria-prima vegetal, também são parâmetros que devem ser criteriosamente avaliados (WHO, 1993; TOLEDO *et al.*, 2003).

Por esta razão, a espécie *Peumus boldus* Molina, nativa e abundante no centro e sul chileno, foi selecionada neste estudo. Este, representa um caso de planta medicinal no qual o uso é intensamente fundamentado na medicina tradicional e que há muito vem sendo objeto de considerável atenção do ponto de vista farmacológico e químico (SPEISKY e CASSELS, 1994).

Botanicamente descrito por Abbé Molina há dois séculos atrás, o *Peumus boldus* cresce espontaneamente no Chile entre 33° e 39°, da região árida e semi-árida de Limari, a fria e chuvosa região de Osorno. O seu uso mais comum na medicina tradicional é para o tratamento de uma variedade de afecções do sistema digestivo e hepatobiliar. Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), encontram-se no mercado brasileiro 12 apresentações de fitoterápicos

simples de *Peumus boldus* registrados até o presente (BRUN, 1936; COIMBRA e SILVA, 1958; GUPTA, 1995; SILVA, 2005).

## **1. OBJETIVOS GERAIS**

---

## **1. OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo botânico das folhas e do pó de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae), desenvolver e validar um método analítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação da boldina em extratos de folhas secas, realizar um estudo de estabilidade acelerada e de quantificação de metais pesados.

Os objetivos específicos encontram-se descritos nos próprios capítulos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

*Peumus boldus* Molina pertence à família Monimiaceae e é originário das montanhas do Chile (HÉRAIL, 1927; BRUN, 1936; PLANCHON *et al.*, 1946; PARIS e MOYSE, 1967; BISSET *et al.*, 1994; GUPTA, 1995; ALONSO, 1998), particularmente das regiões de Valparaíso, Santiago e Concepcion (MARTÍN e DOLI, 1998).

A família Monimiaceae, segundo BARROSO (1978) e SCHULTZ (1984) pertencia à ordem Magnoliales. Autores mais recentes, como CRONQUIST (1988) e TAKHTAJAN (1996), colocam-na na ordem Laurales, subordem Monimiineae. É considerada uma pequena família, com cerca de 450 espécies e 32 gêneros (SCHULTZ, 1984; TAKHTAJAN, 1996), na maioria tropicais e subtropicais, especialmente do Hemisfério Sul. No Brasil, está representada por 6 gêneros e cerca de 84 espécies (BARROSO, 1978), sendo que o gênero *Peumus* possui apenas esta espécie.

*Peumus boldus*, conhecido popularmente como boldo ou boldo-do-chile, é um arbusto ou árvore pequena, dióica, em cujas populações a relação de indivíduos masculinos e femininos é de 1:5 (HOFFMANN, 1981). As citações na literatura sobre a altura que a espécie alcança são divergentes. Segundo GUPTA (1995), alcança até 2 metros de altura; segundo ALONSO (1998) e PDR (2000) de 5 a 6 metros, segundo BRUN (1936), de 7 a 8 metros, e segundo MARTÍN e DOLI (1998) até 20 metros. A copa é arredondada e o tronco é curto. A ramificação é abundante e os ramos são cilíndricos (GUPTA, 1995). As flores são unissexuais, pistiladas e estaminadas, brancas a branco-amareladas, dispostas em inflorescências do tipo racemosa com 3 a 15 flores, terminais ou axilares. A antese ocorre no período do inverno. Os frutos são drupas carnosas e doces, ligeiramente amarelos, aromáticos de 4 a 8 mm de comprimento, com amadurecimento no verão e dispersão, principalmente ornitófila. Estes podem permanecer na planta até a temporada seguinte, com um involúcro seco de coloração negra (MARTÍN e DOLI, 1998).

As folhas de *Peumus boldus* são curtamente pecioladas, inteiras, grossas, coriáceas, quebradiças, elípticas, oval-elípticas (HÉRAIL, 1927; BRUN, 1936;

BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON *et al.*, 1946; YOUNGKEN, 1951; COIMBRA, 1958; PARIS e MOYSE, 1967; OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996; BRITISH, 2000; FARMACOPOEA, 2002), oblongas ou obtusas (BRUN, 1936; BRANDT *et al.*, 1942), de ápice obtuso (YOUNGKEN, 1943; COIMBRA, 1958; OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996), agudo, arredondado (HÉRAIL, 1927; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON *et al.*, 1946; YOUNGKEN, 1951) ou mucronado (YOUNGKEN, 1943; BRITISH, 2000; FARMACOPOEA, 2002). A base é arredondada e simétrica ligeiramente dentada (YOUNGKEN, 1951; OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996; FARMACOPOEA, 2002). O comprimento da lâmina foliar é de 3 a 7 cm e a largura de 1 a 5 cm (YOUNGKEN, 1943; YOUNGKEN, 1951). A lâmina é de cor cinzento-esverdeada e cinzento-prateada (BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; YOUNGKEN, 1951; OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996; BRITISH, 2000; FARMACOPOEA, 2002), mostrando-se algumas vezes avermelhada (OLIVEIRA *et al.*, 1991), com os bordos ligeiramente emarginados e revolutos (HÉRAIL, 1927; BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON, 1946; YOUNGKEN, 1951; COIMBRA, 1958; PARIS e MOYSE, 1967; FARMACOPÉIA, 1996; FARMACOPOEA, 2002). A face adaxial é áspera ao tato, com muitas protuberâncias, onde se inserem tricomas simples, bifurcados ou estrelados (BRUN, 1936; BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; YOUNGKEN, 1951; COIMBRA, 1958; OLIVEIRA *et al.*, 1991; BISSET e WITCHL, 1994; FARMACOPÉIA, 1996; BRITISH, 2000). A face abaxial é quase lisa, com poucas protuberâncias, com tricomas entre as nervuras, sendo essas visivelmente salientes. As nervuras secundárias são geralmente indivisas até quase a margem, onde se anastomosam. Observada por transparência, a folha mostra pontos translúcidos, formados por glândulas oleíferas (BRUN, 1936; BRANDT *et al.*, 1942; PLANCHON *et al.*, 1946; PARIS *et al.*, 1967; OLIVEIRA *et al.*, 1991; BISSET *et al.*, 1994; FARMACOPÉIA, 1996; BRITISH, 2000; FARMACOPOEIA, 2002), responsáveis por seu odor aromático (GUPTA, 1995). A nervação é descrita como do tipo reticulada por YOUNGKEN (1943 e 1951), e como do tipo pinada na Farmacopéia Portuguesa (FARMACOPOEIA, 2002).

Secções transversais das folhas revelam uma epiderme superior de células alongadas tangencialmente, com cutícula externa grossa, mais ou menos ondulada, paredes grossas e proeminências onde ficam inseridos grupos de tricomas

unicelulares com paredes grossas (BRUN, 1936; BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON, 1946; YOUNGKEN, 1951; OLIVEIRA *et al.*, 1991; BISSET *et al.*, 1994; FARMACOPÉIA, 1996), tricomas bifurcados ou estrelados (OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996). A hipoderme é composta geralmente por duas (HÉRAIL, 1927; BRANDT, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON, 1946; YOUNGKEN, 1951; PARIS e MOYSE, 1967) ou três camadas de células (BRANDT *et al.*, 1942). O parênquima paliçádico é formado por duas camadas de células colunares contendo cloroplastídios (BRUN, 1936; BRANDT, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON, 1946; YOUNGKEN, 1951; FARMACOPÉIA, 1996) e células secretoras (HÉRAIL, 1927; BRUN, 1936; BRANDT *et al.*, 1942; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON, 1946; YOUNGKEN, 1951; PARIS e MOYSE, 1967; BISSET *et al.*, 1994; FARMACOPÉIA, 1996). O parênquima esponjoso é formado de pequenas células irregularmente arredondadas ou alongadas e grandes espaços intercelulares, onde se observam cistólitos (BRUN, 1936; YOUNGKEN, 1943; YOUNGKEN, 1951). A epiderme inferior é formada por uma camada de células claramente alongadas tangencialmente, apresentando tricomas unicelulares e estrelados (BRUN, 1936; YOUNGKEN, 1943; PLANCHON *et al.*, 1946; YOUNGKEN, 1951). O estômato é anomocítico estreito, rodeado de até sete células paraestomatais (OLIVEIRA *et al.*, 1991; FARMACOPÉIA, 1996).

O pó apresenta-se com coloração amarelo-esverdeada a amarelo-pardacenta. Caracteriza-se por porções da epiderme, hipoderme e de parênquima paliçádico; porções do mesofilo com cristais de oxalato de cálcio e fragmentos do sistema vascular com porções de fibras, elementos traqueais e parênquima. Também mencionam a presença de tricomas tectores unicelulares simples, bifurcados ou estrelados (BRITISH, 2000; FARMACOPÉIA, 2002).

## **2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E USOS POPULARES**

### **2.2.1 Etnofarmacologia**

O boldo foi uma planta muito empregada pelas comunidades indígenas dos Andes chilenos, sobretudo pelas etnias qollahuayas e mapuche, que o aplicavam em casos de luxações e dores reumáticas (SPEISKY e CASSELS, 1994).

Na medicina tradicional, preparações contendo boldo são geralmente indicadas para o tratamento de doenças dos sistemas digestivo e hepatobiliar (SPEISKY e CASSELS, 1994). Algumas de suas utilizações na medicina popular são listadas a seguir:

- ✓ Estimulante de secreções gástricas facilitando, desta forma, o processo de digestão (HÉRAIL, 1927; BRUN, 1936; PLANCHON *et al.*, 1946; PARIS e MOYSE, 1967; COIMBRA e SILVA, 1958; BISSET e WITCHL, 1994; GUPTA, 1995; THE COMPLETE, 1998; DUKE, 2000);
- ✓ Antidispéptico (THE COMPLETE, 1998; PDR, 2000; BRUNETON, 2001);
- ✓ Colerético e colagogo, aumentando a secreção biliar e modificando a composição da bile, que se torna mais fluida, menos viscosa e mais pobre em muco (HÉRAIL, 1927; BRANDT *et al.*, 1942; PLANCHON *et al.*, 1946; COIMBRA *et al.*, 1958; PARIS e MOYSE, 1967; BISSET e WITCHL, 1994; DUKE, 2000; PDR, 2000; NEWALL *et al.*, 2002; THE REVIEW, 2002);
- ✓ Antiespasmódico (PDR, 2000);
- ✓ Utilizado em disfunções intestinais, perda do apetite e tensão muscular (DUKE, 2000);
- ✓ Cataplasmas de boldo são usados para neuralgias e dores reumáticas (GUPTA, 1995);
- ✓ Associado a drogas como a alcachofra é utilizado para ardores esofágicos e epigástricos, e associações com cáscara sagrada são usadas em constipação (BRUNETON, 2001; THE REVIEW, 2002);
- ✓ Utilizado no tratamento de cálculos biliares, dor hepática, cistite, reumatismo e, em especial, colelitíase acompanhada de dor (BRUN, 1936; PARIS e MOYSE, 1967; NEWALL *et al.*, 2002);
- ✓ Diurético (HÉRAIL, 1927; PARIS e MOYSE, 1967; BISSET *et al.*, 1994; NEWALL *et al.*, 2002);

Segundo a ESCOP (1997), as indicações terapêuticas das folhas de *Peumus boldus* são para disfunções hepatobiliares menores, tratamento sintomático de distúrbios digestivos leves e como um adjuvante na constipação.

### 2.2.2 Atividade antioxidante

Folhas de *Peumus boldus* são ricas em alcalóides aporfínicos, antioxidantes naturais muito potentes; e atividades farmacológicas de citoproteção, promoção antitumoral, antiinflamatória e antipirética são associadas a esta atividade antioxidante (O'BRIEN *et al.*, 2005). Esta atividade de extratos de *Peumus boldus* e da boldina já foi amplamente investigada, como indicado a seguir.

RÍOS e colaboradores (1990) observaram que alguns alcalóides benzilisoquinolínicos fenólicos inibiram a peroxidação lipídica induzida por  $Fe^{2+}$ /cisteína (como produção de substâncias reativas ao tiobarbitúrico ou TBARS) de membranas microsomais de fígados de ratos. Após, usando o mesmo modelo experimental, outros investigadores fizeram observações similares com a boldina (MARTINEZ *et al.*, 1992). Subseqüentemente, os autores descobriram que alguns destes alcalóides também protegeriam a desoxirribose contra a degradação induzida por  $Fe^{3+}$  - EDTA na presença de peróxido de hidrogênio, presumidamente agindo como seqüestrador de radicais hidroxil ( $HO\cdot$ ) (UBEDA *et al.*, 1993). De fato, em estudos visando a elucidação do mecanismo antioxidante da boldina, CEDERBAUM e colaboradores (1992) estabeleceram que a boldina age como um eficiente seqüestrador de radicais hidroxila. Esta capacidade foi confirmada por JANG e colaboradores (2000) e YOUN e colaboradores (2002).

A boldina mostrou inibição da oxidação de LDL *in vitro* e da aterosclerose *in vivo* em ratos (SANTANAM *et al.*, 1991) e atividade antioxidante em ensaio de peroxidação lipídica, onde se mostrou seis vezes mais potente que o padrão catequina (SCHMEDA-HIRSCHIMANN *et al.*, 2003).

SPEISKY e colaboradores (1991) mostraram que baixas concentrações de boldina ( $IC_{50}$  = de  $5 \times 10^{-6}$  a  $15 \times 10^{-6}$  M) protegeram efetivamente membranas de células plasmáticas vermelhas do sangue contra o AAPH (2,2' - azobis [2-amidinopropano]), componente solúvel em água que gera radicais alquilperoxil em condições de decomposição térmica. Estes mesmos autores demonstraram que a

boldina inibiu a autooxidação espontânea de lipídios de membrana do cérebro (determinada pela produção de TBARS e quimioluminescência) com um  $K_i$  aparente de aproximadamente 19-30  $\mu\text{M}$ .

LANHERS e colaboradores (1991) mostraram que concentrações micromolares de boldina protegeram hepatócitos contra danos induzidos pela *t*-BOOH, confirmando sua ação hepatoprotetora através de testes *in vitro* e *in vivo*. Porém, não se confirmou a possível ação colerética em ratos, mencionada em indicações tradicionais da espécie.

KRINGSTEIN e colaboradores (1995) constataram o efeito preventivo da boldina na peroxidação não-enzimática de lipídios microssomais do fígado humano iniciado por  $\text{Fe}^{3+}$ -ATP com NADPH ou NADH como cofatores ou iniciado por  $\text{CCl}_4$  e NADPH como cofator. Além disso, a boldina demonstrou prevenir a peroxidação e inativação do citocromo P4502E1.

JANG e colaboradores (2000) constataram um efeito protetor da boldina em injúria oxidativa mitocondrial em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina (STZ), verificando que a boldina pode exercer um efeito inibitório na injúria oxidativa tecidual produzida por STZ, e alterar a atividade antioxidante da enzima pela decomposição de espécies de oxigênio reativo e pela inibição da produção de óxido nítrico e redução da formação do produto de peroxidação. Além disso, a boldina pode atenuar o desenvolvimento de diabetes em ratos provocado por STZ e interferir no estresse oxidativo, uma das patogêneses do diabetes mellitus.

KUBÍNOVÁ e colaboradores (2001) investigaram possíveis efeitos quimioprotetores da boldina através de modulações *in vitro* de enzimas metabolizantes de fármacos em linhagens de células Hepa-1 de hepatomas de ratos e microssomos hepáticos de ratos. A boldina manifestou atividade inibitória no microssomo hepático e estimulou a atividade de células Hepa-1, podendo decrescer a ativação metabólica de outros xenobióticos incluindo mutações químicas. Estas descobertas sugerem a possibilidade que, em adição a sua atividade seqüestrante de radicais livres, a boldina pode também proteger componentes de células vitais, não só pelo decréscimo da ativação metabólica de xenobióticos potencialmente tóxicos, mas, também, por aumentar a sua remoção.

Ainda, a análise do efeito protetor nas células sangüíneas vermelhas e proteínas do plasma de uma tintura comercial de *Peumus boldus*, apresentou proteção contra o Tenécio-99 (REINIGER, 1999a) e em células bacterianas (REINIGER, 1999b) e na injúria neuronal associada com oxidação da catecolamina, conferindo um potencial efeito protetor neuronal à boldina (YOUN *et al.*, 2002).

Além disso, o extrato aquoso de *Peumus boldus* mostrou atividade antioxidante pela descoloração de uma solução metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (SCHMEDA-HIRSCHIMANN *et al.*, 2003).

### **2.2.3 Atividade antiinflamatória**

A administração de um extrato purificado de *Peumus boldus* exerceu um efeito antiinflamatório através do teste de edema em patas de ratos induzido por carragenina, na dose de 100 mg/kg o edema diminuiu em 55%, enquanto que altas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg reduziram em 75% e 89% a evolução do edema, respectivamente. Este efeito não se repetiu quando a boldina (10 ou 20 mg/kg) foi administrada isolada (LANHERS, 1991).

No entanto, em 1994 BACKHOUSE e colaboradores demonstraram que a boldina é muito efetiva ( $CE_{50} = 34$  mg/kg; p.o.) em reduzir edema em pata de cobaias induzido por carragenina e na prevenção (60 mg/kg; p.o.) do aumento da temperatura retal em coelhos tratados com pirogênios bacterianos.

Relatos indicam que a atividade antiinflamatória está ligada a ação antioxidante da planta, já que moléculas que podem interferir na geração de espécies reativas de oxigênio, podem, também, possuir propriedades antiinflamatórias (O'BRIEN *et al.*, 2005).

### **2.2.4 Atividade fotoprotetora**

HIDALGO e colaboradores em 1998 mostraram que a boldina é foto-instável quando irradiada a comprimentos de onda acima de 300 nm e exerce um efeito fotoprotetor contra raios UV-B em ratos, em testes *in vivo* e *in vitro*. A fotoproteção foi evidenciada pelo aumento na temperatura da pele de roedores induzido por raios UV.

Mais recentemente, RANCAN e colaboradores (2002) investigaram as propriedades fotoprotetoras da boldina em humanos. Estes autores observaram que a aplicação da boldina (25 mM) em uma área de 12 cm<sup>2</sup> protegeu a pele contra a formação de eritemas, na mesma extensão de um fotoprotetor com fator de proteção solar 5.

### **2.2.5 Atividade antimicrobiana**

O óleo essencial das folhas de *Peumus boldus* mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como: *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (VILA *et al.*, 1999).

### **2.2.6 Estudos toxicológicos**

Estudos sobre a genotoxicidade do boldo também foram realizados, e a boldina demonstrou ser não-mutagênica no cromoteste SOS e no Teste Ames, com ou sem antecedentes de ativação metabólica (MORENO *et al.*, 1991). Outro estudo definiu que a boldina nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/ml não induziu acréscimo na frequência de aberrações cromossômicas e mudanças em cromátides irmãs em um estudo *in vitro*; já na análise *in vivo*, houve separação e quebras de cromátides na concentração de 225 mg/kg de boldina (TAVARES e TAKAHASHI, 1994).

Por fim, a avaliação toxicológica do extrato hidroalcolico de folhas secas de *Peumus boldus* e boldina em ratos, demonstrou que ratas prenhas, tratadas oralmente com 800 mg/kg do extrato e de boldina, tiveram alterações anatômicas no feto. Também foram observados incidentes de ação blastocistotóxica/antizigótica e poucos casos de atividade abortiva, além de alterações histológicas no fígado dos ratos, o que sugere moderação e cuidado na administração do boldo, especialmente a longo prazo e nos primeiros três meses de gestação (ALMEIDA *et al.*, 2000).

## **2.3 ASPECTOS QUÍMICOS**

As folhas de *Peumus boldus* são caracterizadas pela presença de taninos (1,2%), óleos essenciais (2-3%), cumarinas (0,5%), alcalóides (0,1-0,7%) e flavonóides (FARMACOPÉIA, 1988; ESCOP, 1997; THE COMPLETE, 1998; VOGEL

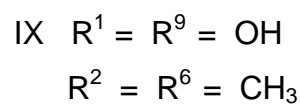
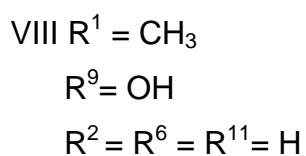
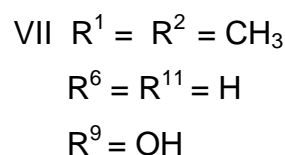
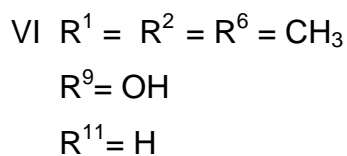
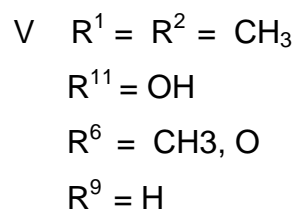
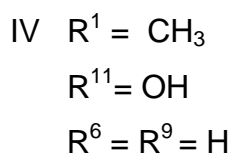
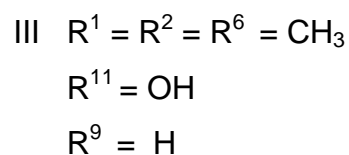
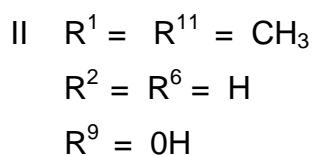
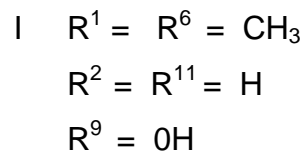
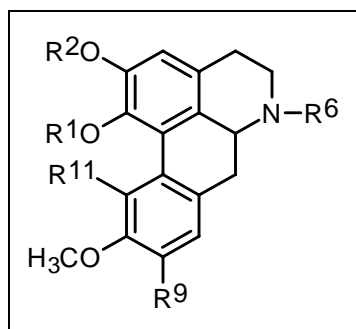


*et al.*, 1999; BRITISH, 2000; HERBAL, 2000; NEWALL *et al.*, 2002; THE REVIEW, 2002).

O óleo essencial das folhas da espécie, em sua constituição química, apresenta cerca de 46 componentes diferentes, em sua maioria compostos monoterpenos (90,5% do total) como limoneno (17%), p-cimeno (13,6%), 1,8-cineol (11,8%),  $\beta$ -felandreno (8,4%), sabineno (6,3%),  $\alpha$ -pimeno (5,3%), terpine-4-ol (5,3%) e  $\alpha$ -terpineol (5,2%). Neste mesmo estudo o ascaridol foi encontrado em baixas concentrações (1,0%) (VILA *et al.*, 1999); diferindo de outras literaturas nas quais o ascaridol e o cineol são encontrados em maiores concentrações, 45% e 30%, respectivamente (WASICKY, 1963; SPEISKY e CASSELS, 1994).

A classe dos flavonóides está presente e cinco glicosídeos flavônicos são identificados: pneumosídeo (ramnetina-3-arabinosídeo-3'-ramnosídeo), boldosídeo (isoramnetina 3-glucosídeo-7-ramnosídeo), fragosídeo (isoramnetina diramnosídeo), campferol-3-glucosídeo-7-ramnosídeo e isoramnetina-3-arabinosídeo-7-ramnosídeo (SPEISKY e CASSELS, 1994).

Os alcalóides são os responsáveis pelas atividades farmacológicas do boldo. A boldina foi o primeiro alcalóide isolado e identificado como (S)-2,9-diidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina [(I), Fig. 2.1]. Logo, foram identificados outros alcalóides: isoboldina (II), isocoridina (III), norisocoridina (IV), isocoridina N-óxido (V), n-metilaurotetanina (VI), laurotetanina (VII), laurólitsina (VIII) e reticulina (IX). Também foram isolados alguns alcalóides não-aporfinóides como a coclaurina, laudanosina e laudanosolina (HUGHES *et al.*, 1968a, HUGHES *et al.*, 1968b; SPEISKY e CASSELS, 1994).



**Figura 2.1** Estrutura química de alcalóides aporfínicos isolados de *Peumus boldus*.

A detecção e quantificação dos alcalóides foi realizada por técnicas analíticas convencionais variadas como Cromatografia Gasosa (VILA *et al.*, 1999; VOGEL *et al.*, 1999); Espectrofluorimetria Derivativa (VILCHEZ, 1994); Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e CLAE, estas descritas nas Tabelas 2.1 e 2.2.

**Tabela 2.1** Análises em CCD relatadas para *Peumus boldus*\*.

Fase Móvel	Revelador	Autor
Clorofórmio: dietilamina (75:25)	Luz ultravioleta 254 nm.	PIETTA e MAURI, 1988.
Acetato de etila: acetona: metanol: dietilamina (45:30:20:5)	Luz ultravioleta 254 nm Reagente de Dragendorff	FARMACOPÉIA, 1996.
A,B = tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10) C = tolueno: acetato de etila (93:7) D = acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	A = Luz ultravioleta 365 nm B = Reagente de Dragendorff C=Vanilina sulfúrica D= Reagente Natural A	WAGNER e BLADT, 1996.
Metanol: dietilamina: tolueno (10:10:80)	Solução de iodobismutato de potássio e nitrito de sódio.	BRITISH, 2000; FARMACOPOEA, 2002.

\* As bibliografias consultadas relatavam cromatoplacas de sílica gel como fase estacionária.

**Tabela 2.2** Análises por CLAE relatadas para *Peumus boldus*.

Sistema	Coluna	Fluxo (ml/min)	Detector (UV)	Autor
Isocrático Acetonitrila: água: trietilamina (87:15:0,2) pH 2,6 -ácido fosfórico 10%	C <sub>18</sub> Bondapack (30 cm x 3,9 mm d.i.)	1,8	270 nm	PIETTA e MAURI, 1988.
Isocrático Acetonitrila: água (77,4:22,6) 0,05% dietilamina	Spherisorb SS ODS S1 (30 cm x 4,6 mm d.i.) 30° C	0,8	304 nm.	BETTS, 1990.
Isocrático Acetonitrila: perclorato de sódio 0,1 M (aquoso) (15:15; v/v) pH 3,0 - ácido perclórico	RP-8 (Merck) (25 cm x 4 mm d.i.)	1,5	302 nm	ORSI <i>et al.</i> , 1997.
Isocrático A= acetonitrila: dietilamina (99,8:0,2) B= água: dietilamina (99,8:0,2) A:B = (16:84)	C <sub>18</sub> 5 µm	1,5	304 nm	BRITISH, 2000; FARMACOPOEA, 2002.

### **3. ANÁLISE BOTÂNICA**

---

### 3.1. INTRODUÇÃO

Matérias-primas oriundas de plantas medicinais podem ser categorizadas de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas. Um exame para determinar estas características é o primeiro passo para estabelecer a identidade e o grau de pureza destes materiais (WHO, 1998).

Drogas vegetais são identificadas macroscopicamente com base na forma, tamanho, coloração, textura, aspectos da fratura e características da superfície cortada. Estas características são úteis na caracterização da droga em exame. Entretanto, como a identificação macroscópica é bastante subjetiva e, ainda, substituintes ou adulterantes podem apresentar características muito semelhantes ao material verdadeiro, sempre se faz necessária a análise microscópica (WHO, 1998; SHARAPIN, 2000).

As características microscópicas são visualizadas ao microscópio com adição ou não de corantes e/ou reagentes químicos. A análise microscópica é indispensável quando se trata de drogas rasuradas ou pulverizadas e auxilia na sua identificação, podendo ser fundamental para o reconhecimento de adulterantes (WHO, 1998; SHARAPIN, 2000).

Estudos botânicos têm como objetivo a identificação inequívoca de uma espécie vegetal (SONAGLIO *et al.*, 2003), evitando, desta forma, a adulteração ou substituição de espécies e da parte usada como farmacógeno, e até mesmo o uso de plantas consideradas tóxicas (NEWALL *et al.*, 2002).

A qualidade das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos comercializados vem sendo afetada, negativamente, pelo aumento da demanda dos mesmos. Estudos demonstraram que na última década do século passado, cerca de 50% dos produtos fitoterápicos disponíveis no comércio brasileiro, apresentaram alguma irregularidade devido à presença de matéria orgânica estranha, sujidades e insetos, problemas de identificação botânica ou teores de fitocompostos abaixo do especificado e adulteração (MARQUES e BÓRIO, 1991).

Desta forma, a monografia de uma droga vegetal tem por objetivo descrever as características macro e microscópicas, as quais devem ser comparadas com as

da amostra da droga sempre que novos lotes da espécie forem adquiridos, como primeiro passo para a produção de fitoterápicos de qualidade (SHARAPIN, 2000).

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar botanicamente as folhas de *Peumus boldus*, definindo:

- a. descrição e representação da folha;
- b. descrição e representação de caracteres microscópicos da lâmina foliar;
- c. descrição e representação de caracteres microscópicos do pecíolo;
- d. identificação, descrição e representação dos elementos microscópicos encontrados no pó.

**4. ENSAIOS DE PUREZA**

***E ANÁLISE QUANTITATIVA DA DROGA VEGETAL***

---

## 4.1 INTRODUÇÃO

A participação de plantas medicinais e de medicamentos de origem vegetal é crescente no arsenal terapêutico. Desta forma, a necessidade de efetuar o controle de qualidade, através de técnicas modernas e eficientes, também cresce (SHARAPIN, 2000).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima e o produto para o uso ao qual se destina. Os parâmetros da qualidade para fins farmacêuticos são, em princípio, estabelecidos nas Farmacopéias. Estas são códigos oficiais ou oficialmente adotados, onde são descritos os padrões de qualidade dos medicamentos e os métodos para sua análise (SHARAPIN, 2000; FARIAS *et al.*, 2003).

Em se tratando de plantas medicinais, o controle de qualidade assume particular importância. Isto porque alguns parâmetros essenciais para a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, do produto final, podem variar quanto à composição química, pureza e características fenotípicas, dependendo da procedência do material, bem como quanto a fatores externos como: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem e transporte, parte da planta usada, entre outros (CALIXTO, 2001; FARIAS *et al.*, 2003).

Dentre parâmetros de pureza, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que as especificações farmacopéicas para o material vegetal incluam a determinação de cinzas totais, perda por dessecação e quantidade de elementos estranhos (SHARAPIN, 2000). O estabelecimento de parâmetros quantitativos, no caso de matérias-primas vegetais, é significativamente mais complexo do que para matérias-primas sintéticas.

Dentre as técnicas descritas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) vem se destacando na química analítica, por ser reconhecidamente a mais adequada para a determinação quantitativa dos marcadores químicos, permitindo identificar e quantificar substâncias, mesmo na presença de interferentes da matriz vegetal ou no analito (FARIAS *et al.*, 2003; PAVEI, 2004; RIBANI *et al.*, 2004). A CLAE é considerada um método rápido e preciso, permitindo a separação e



doseamento de quantidades relativamente pequenas de material (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Agregado ao desenvolvimento de metodologias analíticas quantitativas utilizando CLAE, a necessidade de se mostrar a qualidade do método, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. E, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico é um processo dinâmico e imprescindível para a demonstração de sua adequabilidade para a aplicação pretendida e deve ser considerada parte de qualquer estudo de desenvolvimento de metodologia (ERMER, 2001). Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação estão disponíveis atualmente (ICH, 1996; USP, 2005; ANVISA, 2003). Nenhum destes órgãos, porém, traz regulamentações específicas para matérias-primas vegetais e fitoterápicos. Sendo assim, os parâmetros de desempenho analítico utilizados estão fundamentados naqueles utilizados para os medicamentos, e são eles:

**I) Especificidade / Seletividade:** é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, devem ser tomadas as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são necessários para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

**II) Linearidade:** define-se como a proporção entre a quantidade ou a concentração do analito e a sua resposta (área, altura), bem como o intervalo de confiança para o qual o método é satisfatório. É normalmente referida como a variância do declive da linha de regressão. Deve abranger, no mínimo, cinco concentrações no intervalo de 80 – 120%.

**III) Exatidão:** indica a capacidade que o método analítico possui de proporcionar resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro. Na prática

traduz a percentagem de recuperação do composto cuja concentração da amostra se conhece exatamente. Executa-se, para esta análise, no mínimo três níveis de concentração.

**IV) Precisão**: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla, de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Conforme o ICH (1996) e a Resolução n°. 899 (BRASIL, 2003), a precisão pode ser medida em três níveis:

- **Repetibilidade**: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista. É verificada por nove determinações em três níveis de concentração, ou seis determinações a 100% da concentração teste.
- **Precisão Intermediária**: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes (no mínimo dois), com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- **Reprodutibilidade**: definida como a variação inter-laboratorial. Verifica-se que o método fornece os mesmos resultados em diferentes laboratórios.

**V) Limite de Detecção (LD)**: representa a mais baixa concentração da substância em exame, que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. Pode ser calculado com base no desvio padrão (DP) da resposta e a inclinação (I) da curva padrão a níveis próximos ao LD a partir da fórmula  $LD = 3,3 (DP/I)$ ; ou na avaliação visual em métodos não instrumentais e na relação sinal-ruído para procedimentos analíticos que exibem ruído de base.

**VI) Limite de quantificação (LQ)**: representa a quantidade mínima de amostra que pode ser quantificada com a precisão e exatidão adequadas. Da mesma forma, pode ser calculado a partir da fórmula  $LQ = 10 (DP/I)$ , ou na avaliação visual em métodos não instrumentais e na relação sinal-ruído.

**VII) Robustez**: corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. A robustez do

método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição química da fase móvel, pH, temperatura, etc. e a respectiva determinação do seu efeito sobre os resultados obtidos.

Tanto o ICH (1996) como a USP 28 (2005) reconhecem que não há necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros são relevantes para o desempenho do processo analítico e devem ser investigados, sendo de responsabilidade do analista identificá-los, para que os resultados gerados pela aplicação do método sejam de total confiabilidade quando o seu uso for rotineiro (SWARTZ e KRULL, 1997).

## **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver métodos para a avaliação analítica da droga vegetal *Boldus folium* quanto aos seguintes aspectos:

- a. teor de cinzas totais;
- b. perda por dessecação;
- c. materiais estranhos para a droga vegetal;
- d. estabelecer e otimizar um sistema de análise por CLAE para quantificação de boldina;
- e. validar a metodologia desenvolvida por CLAE.

## **4.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.3.1 Material vegetal**

Folhas dessecadas de *Peumus boldus*, utilizadas para o desenvolvimento das análises, foram obtidas em empresas farmacêuticas na cidade de Porto Alegre, nos meses de maio e agosto de 2004. Após identificação realizada pela Bióloga Botânica Prof. Dra. Lilian A. Mentz, as mesmas foram armazenadas em vidros âmbar a temperatura ambiente. A Tabela 4.1 apresenta as amostras utilizadas nos ensaios de pureza.

**Tabela 4.1** Listagem das amostras industriais e comerciais de *Peumus boldus* utilizadas nos ensaios de pureza.

Nº	Local de obtenção	Condição do material	Ano
1*	Ind. farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	Rasurado	2004
2	Ind. farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	Rasurado	2004
3	Ervanário (Manaus – Brasil)	Rasurado	2004

\* amostra utilizada na análise quantitativa por CLAE.

### 4.3.2 Ensaio de pureza

#### 4.3.2.1 Determinação do teor de cinzas totais (F. B. 4 ed., 2000)

As amostras da espécie foram avaliadas em triplicata conforme especificações da Farmacopéia Brasileira 4 ed. (2000). Os resultados foram obtidos calculando-se a porcentagem de resíduo em relação ao material vegetal seco.

#### 4.3.2.2 Determinação da perda por dessecação

Nesta análise, os métodos gravimétrico e de secagem em balança de infravermelho foram comparados pelo teste estatístico “t” de *Student*.

*Método gravimétrico* (F. B. 4 ed., 1988)

A técnica utilizada neste ensaio está descrita na Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988) e foi realizada em triplicata e os resultados expressos em massa percentual.

*Método de secagem em balança de infravermelho*

Esta análise ocorreu em triplicata e os resultados foram fornecidos pela balança em perda de massa percentual. A balança utilizada é acoplada ao sistema de secagem por irradiação em infravermelho (termobalança-Top Ray) com rampa de aquecimento para 105° C. As amostras rasuradas (cerca de 1 g) foram acomodadas em pratos de alumínio previamente dessecados em estufa (105° C/ 1 hora).

#### 4.3.2.3 Determinação de materiais estranhos (F. B. 4 ed., 2000)

Cinquenta gramas de material foram analisados conforme especificação da Farmacopéia Brasileira 4 ed. (FARMACOPÉIA, 2000). O resultado foi expresso em percentual de materiais estranhos.

### 4.3.3 Análise quantitativa

#### 4.3.3.1 Preparação dos extratos

Dois gramas de material pulverizado em moinho de facas foram inseridos em erlenmeyer de 250 ml. Acrescentaram-se, então, 50 ml de solução de ácido clorídrico 8% (v/v), e o erlenmeyer foi levado a banho de água a 80° C, durante 30 minutos. O extrato foi filtrado para balão volumétrico de 100 ml e a operação foi repetida com mais 50 ml do ácido clorídrico diluído. Após resfriados os filtrados, o volume no balão volumétrico foi ajustado com água destilada e os mesmos foram levados a um funil de separação, onde foram agitados com 100 ml de uma mistura de volumes iguais de acetato de etila P.A. (SYNTH) e *n*-hexano P.A. (SYNTH). O pH da fase aquosa foi ajustado a 8,5 – 9,0 com hidróxido de amônio P.A. (SYNTH), e extraído sucessivamente com 100 ml, 50 ml e 50 ml de diclorometano P.A. (QUIMEX). As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas em evaporador rotatório até a secura. O resíduo foi então retomado em balão volumétrico de 5 ml com acetonitrila (grau analítico para CLAE / MERCK), obtendo uma solução com concentração teórica final de 400 mg/ml, A partir desta, todas as diluições pertinentes a cada parâmetro avaliado foram realizadas.

#### 4.3.3.2 Análise cromatográfica

Os extratos foram diluídos na proporção de 1:1 (v:v) com uma solução de água ultrapura (MiliQ® / Millipore): acetonitrila (grau analítico para CLAE / MERCK) (85:15 v/v). As amostras foram filtradas por membrana filtrante hidrofóbica (Millipore; 0,45 µm; 13 mm) e 10 µl foram injetados em equipamento de CLAE. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### 4.3.3.3 Condições cromatográficas

Os parâmetros utilizados nas análises cromatográficas estão descritos na Tabela 4.1. Todos os solventes utilizados para composição da fase móvel foram previamente filtrados através de membrana (HPLV 047 / Millipore) e desaerados por 15 minutos em banho de ultra-som.

**Tabela 4.2** Parâmetros definidos para a análise cromatográfica dos extratos da espécie *Peumus boldus*.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2690
Detector	Fotodiodos Waters 996
Coluna	Nova-Pak C18 <sup>1</sup>
Pré-coluna	Lichospher <sup>®</sup> Merck <sup>2</sup>
Sistema de eluição	Isocrático
Fase móvel	Água: acetonitrila : ácido trifluoroacético (85:15:0,1)
Vazão	0,6 ml/min
Volume de injeção	10 µl
Comprimento de onda	200 – 400 nm (CLAE/DAD)
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

<sup>1</sup> Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 3,9 x 150 mm / 4 µm

<sup>2</sup> Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak<sup>®</sup> Waters C18 (37-55 µm)

Para identificação do pico da boldina no cromatograma realizou-se coinjeção das amostras e da substância química de referência. Além disso, o cromatograma foi monitorado por Software Empower e os espectros de ultravioleta adquiridos pelo CLAE/DAD foram comparados e sobrepostos.

#### 4.3.3.4 Curva padrão da boldina

Uma solução-mãe da substância química de referência boldina (Sigma-Aldrich) com concentração final de 0,12 mg/ml foi preparada por dissolução em acetonitrila, e a partir desta, diluições foram realizadas obtendo-se sete níveis de concentração, suficientes para abranger os dados para uma posterior quantificação. As soluções preparadas foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata, utilizando os parâmetros cromatográficos descritos no item 4.3.3.3. O experimento foi realizado em três dias consecutivos.

A média das injeções foi obtida após integração dos picos referentes à boldina, que foram utilizadas para a construção de um gráfico de área *versus* concentração, obtendo três curvas respostas. Os dados foram analisados estatisticamente através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e pela análise estatística de variância (ANOVA).

#### **4.3.4 Validação do método analítico**

Os parâmetros utilizados para a validação do método de CLAE foram fundamentados nas normas estabelecidas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996), HONG & SHAH (2000), USP (2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE n.º 899 (BRASIL, 2003) e são eles:

##### **4.3.4.1 Especificidade**

A especificidade do método foi demonstrada através da injeção de diluições da solução descrita em 4.3.3.1, previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) em cromatógrafo Waters Alliance 2690 com detector de arranjo de fotodiodos Waters PDA 996.

##### **4.3.4.2 Linearidade**

Partindo-se da solução preparada conforme o item 4.3.3.1 com concentração teórica final de 400 mg/ml, uma curva foi construída para a amostra contendo sete níveis de concentração contemplada em uma faixa de 70% a 130%. Para cada ponto da curva, 3 determinações foram realizadas, sendo as análises feitas em triplicata. Todas as amostras foram previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm).

A linearidade do método proposto foi verificada através da análise das áreas totais do pico do marcador químico, utilizando o método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

##### **4.3.4.3 Precisão**

###### **Repetibilidade**

Seis diluições a 100% foram preparadas a partir da solução obtida no item 4.3.3.1. As injeções ocorreram em triplicata, em um mesmo dia, sendo as soluções previamente filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

### Precisão intermediária

Neste teste, três diluições foram preparadas a partir da solução obtida no item 4.3.3.1. As injeções ocorreram em triplicatas durante cinco dias consecutivos e as soluções foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm). A partir dos resultados, pode-se obter a precisão intra-dia calculando-se a média, o DP e o DPR para cada dia; bem como a precisão entre-dias, a partir da média dos resultados de cada dia da precisão intra-dia e calculando novamente a média, o DP e o DPR.

### 4.3.4.4 Exatidão

Determinada através do teste de recuperação da solução química de referência, adicionando-se concentrações crescentes de marcador à solução extrativa. Cada diluição foi preparada em triplicata e injetada três vezes, sendo cada uma delas previamente filtrada com membrana em PVDF (0,45 µm). O percentual de recuperação é fornecido pela equação 4.1 abaixo:

**Esquema 4.1** Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico.

$$R\% = \frac{[(C_F - C_A)] \cdot 100}{C_P}$$

Onde:

$C_F$  = concentração do marcador químico no extrato fortificado (mg/ml);

$C_A$  = concentração do marcador químico no extrato, determinado neste método (mg/ml);

$C_P$  = concentração da solução padrão adicionada (mg/ml).

### 4.3.4.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Estes limites foram obtidos com dados da curva padrão da substância química de referência e calculados matematicamente.



**Esquema 4.2** Cálculo para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

$$LD = \frac{(3,3 \cdot S)}{I}$$

$$LQ = \frac{(10 \cdot S)}{I}$$

Onde:

S = desvio padrão médio do intercepto das três curvas padrão;

I = inclinação média das três curvas.

#### 4.3.4.6 Robustez

A robustez foi determinada através de variações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. As variações estão descritas na Tabela 4.2

**Tabela 4.3** Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.

Parâmetros	Atual	Alterado
Coluna Cromatográfica	Nova Pak <sup>®</sup> C18 Waters (4µm; 3,9 x 150 mm)	Symmetry <sup>®</sup> C18 Waters (3,5µm; 4,6 x 75 mm)
Fluxo	0,6 ml / min.	0,8 ml / min.
Fase móvel	ACN : Água : TFA (85:15:0,1; v/v/v)	ACN : Água : TFA (80:20:0,01; v/v/v)

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Ensaio de Pureza

#### 4.4.1.1 Determinação do teor de cinzas totais (F. B. 4 ed., 2000)

A determinação de cinzas totais envolve a determinação tanto da cinza fisiológica quanto da não fisiológica e consiste em medir a quantidade do resíduo não volatilizado após a calcinação da droga (SHARAPIN, 2000).

Conforme BRITISH (2000) e PHARMACOPOEIA (2002), o limite aceito para as folhas de *Peumus boldus* é 13%, já na Farmacopéia Brasileira 4 ed. (FARMACOPÉIA, 1996), o limite é de 10%. Os valores de teor mínimo e máximo, bem como a média, DP e DPR dos resultados obtidos para as três amostras analisadas encontram-se na Tabela 4.3.

**Tabela 4.4** Teor de cinzas totais para amostras de *Peumus boldus*.

Nº de amostras	Teor mínimo - máximo (%)	Teor médio (%) ± DP	DPR (%)
9	8,55 – 9,83	9,42 ± 0,39	4,19

A partir destes dados, pode-se observar que todas as amostras analisadas tiveram valores aceitáveis conforme as Farmacopéias citadas anteriormente. Estes valores concordam com os valores encontrados por BATISTIC e colaboradores (1989), que encontraram teores mínimo de 9,53% e máximo de 12,87%. MELO e colaboradores (2004), em avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Peumus boldus*, encontraram valores que variaram de 11,29% a 15,27%.

#### 4.4.1.2 Determinação da perda por dessecação

O excesso de água em drogas vegetais é responsável pelo crescimento de bactérias e fungos, assim como pela hidrólise de constituintes, podendo acarretar na sua degradação. Além disso, a umidade pode, também, facilitar a atividade enzimática na droga (LIST & SCHIMIDT, 1989; SHARAPIN, 2000; CUNHA *et al.*, 2003; FARIAS *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos com a análise gravimétrica e com a balança de infravermelho estão apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.5** Teor de umidade de amostras de *Peumus boldus*.

Método	Nº de amostras	Teor mínimo – máximo (%)	Teor médio (%) ± DP	DPR (%)
Gravimétrico	9	9,97 – 10,88	10,44 ± 0,32	3,03
Balança IV	9	9,17 – 10,55	9,87 ± 0,44	4,41

Com a análise estatística dos dados, verificou-se que a diferença entre os métodos foi significativa ( $t_{\text{calc}} = 3,37$ ;  $t_{\text{tab}} = 2,120$ ), apesar das médias apresentadas serem muito próximas.

As Farmacopéias Brasileira (1996), Britânica (2000) e Portuguesa (2002) estabelecem limites de 5%, 10% e 10%, respectivamente. Analisando os valores encontrados, percebe-se que os teores mínimo e máximo encontrados ultrapassaram os estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira, e apenas os teores máximos foram superiores aos limites das Farmacopéias Britânica e Portuguesa.

Porém várias bibliografias estabelecem que para matérias-primas vegetais os teores de perda por dessecação podem variar de 8 a 14% (OLIVEIRA *et al.*, 1991; SHARAPIN, 2000; FARIAS *et al.*, 2003).

Em estudo realizado por MELO e colaboradores (2004) o teor de umidade encontrado nas amostras comerciais analisadas variou de 5,91% a 10,07%, obtendo um teor médio de 7,87%, mais baixo que o encontrado neste estudo.

Devido a vários fatores, como procedência da amostra e época de coleta do material vegetal, bem como condições de armazenamento e umidade ambiente no dia em que foi realizada a análise e sabendo-se que materiais vegetais retêm um teor elevado de umidade, os limites encontrados são adequados, sendo possível o uso da faixa de 8 a 14%.

#### 4.4.1.3 Determinação de materiais estranhos (F. B. 4 ed., 2000)

Os resultados médios obtidos pela análise de quarteamento foram de 6,89% para ramos e 2,71% para outros elementos. Os materiais mais encontrados foram folhas de outras drogas, pedras e palhas. As especificações das Farmacopéias pesquisadas são as seguintes: Farmacopéia Brasileira 4 ed. (FARMACOPÉIA, 1996), máximo de 3%; Farmacopéia Italiana (FARMACOPEA, 1991), no máximo 5% de ramos; Farmacopéias Britânica (BRITISH, 2000) e Portuguesa (FARMACOPOEA, 2002), máximos de 4% para ramos e 2% para outros elementos estranhos. Desta forma, os resultados encontrados ficam acima dos limites estabelecidos em todos os compêndios pesquisados.

Em avaliação da qualidade de folhas de boldo comercializadas em Curitiba em 2001, BARBOSA e colaboradores encontraram valores de 1,02% a 10,05%, sendo que o valor médio obtido foi de 5,09%. Neste trabalho, os autores reprovaram cinco das sete amostras pesquisadas. MELO e colaboradores, em 2004, obtiveram uma média 5,86% e concluíram que todas as amostras pesquisadas foram reprovadas.

## 4.4.2 Análise quantitativa

### 4.4.2.1 Análise cromatográfica

Atualmente, a CLAE é aceita como uma das técnicas analíticas mais utilizadas na quantificação de substâncias orgânicas ou de misturas de substâncias. A maioria dos códigos oficiais preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens, como rapidez, simplicidade, sensibilidade, precisão, exatidão e capacidade de automação (QUATTROCCHIO *et al.*, 1992; BITTENCOURT, 2003).

Com relação à quantificação dos alcalóides em uma determinada droga, deve-se diferenciar entre o doseamento dos alcalóides totais presentes ou de apenas um alcalóide específico. A etapa crucial na dosagem dos alcalóides consiste na escolha de um método geral de extração que assegure o esgotamento destes compostos na droga a ser analisada (HENRIQUES *et al.*, 2003).

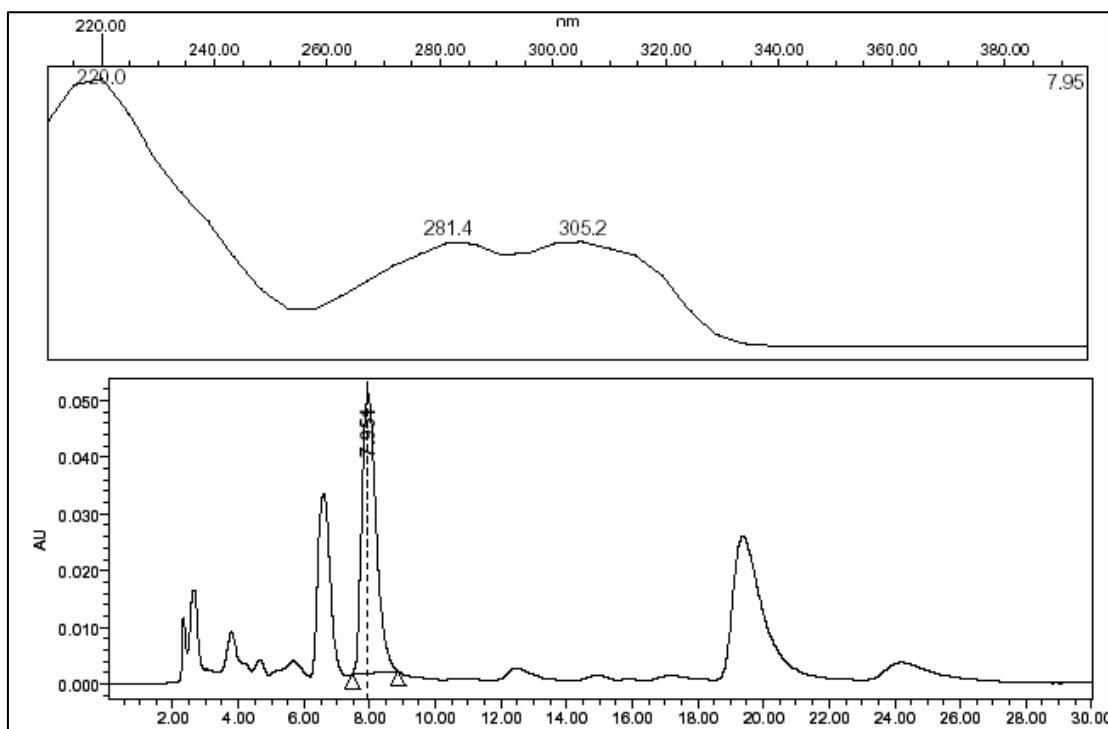
A maioria dos trabalhos que relatam quantificação de alcalóides, na atualidade, inclui as técnicas analíticas de CG (Cromatografia Gasosa) no caso de alcalóides voláteis e CLAE, na maioria das vezes acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos que permite, além da quantificação, a caracterização das diversas classes de alcalóides através de seus espectros de absorção na região do UV (HENRIQUES *et al.*, 2003).

Entre os diversos sistemas cromatográficos testados, selecionou-se o sistema isocrático utilizando como fase móvel uma mistura de água, acetonitrila e ácido trifluoroacético (85:15:0,1; v/v/v). Este sistema apresentou uma melhor resolução na separação da boldina, além de proporcionar o reaproveitamento da fase móvel pela recirculação no aparelho.

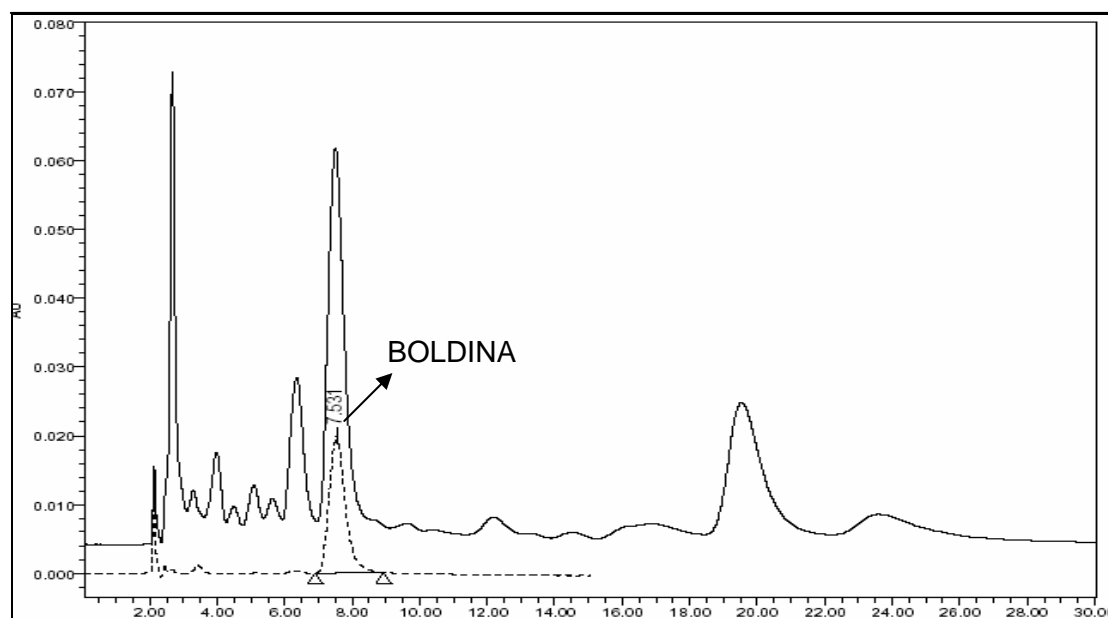
O perfil cromatográfico de *Peumus boldus*, após extração descrita no item 4.3.3.1, analisado segundo o item 4.3.3.2 de acordo com as condições preconizadas em 4.3.3.3, pode ser observado na Figura 4.1.

Verificou-se que o pico majoritário selecionado, após sobreposição dos cromatogramas da amostra e da substância química de referência no mesmo dia (Figura 4.2), e coinjeção, com o objetivo de comparar os seus tempos de retenção e

espectros na região do ultravioleta, corresponde a boldina apresentando UV de absorção mínimo de 281 nm e máximo de 305 nm (Figura 4.1), sendo o último selecionado para a leitura das análises.



**Figura 4.1** Cromatograma de *Peumus boldus* a 305 nm de acordo com o método proposto e destacando a boldina com seu respectivo UV.



**Figura 4.2** Sobreposição dos cromatogramas obtidos com a solução extrativa de *Peumus boldus* com o cromatograma da substância de referência boldina.

Na análise de substâncias básicas como alcalóides usando CLAE em fase reversa, picos com cauda são obtidos devido a retenção de grupos silanol quando é usado acetonitrila e água como eluente. Para melhorar a forma e a separação dos picos, fases móveis ácidas podem ser utilizadas, daí a necessidade do uso de TFA como auxiliar na resolução do cromatograma (PIETTA *et al.*, 1988; DONDI *et al.*, 1989).

Através da análise por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos, foi possível verificar que o grau de pureza do pico majoritário era satisfatório, propondo que o método desenvolvido é bastante adequado para a análise de *Peumus boldus*. Além disso, pôde-se verificar que o método de extração proposto mostrou-se eficiente.

Os alcalóides, por possuírem caráter de base fraca, são convertidos na forma de sal em soluções aquosas de ácidos minerais e, quando tratados com soluções alcalinas, o nitrogênio libera um íon hidrogênio formando uma amina livre, que será solúvel em solventes orgânicos como o diclorometano. Sendo que a extração deve ser precedida por um tratamento com solventes de baixa polaridade para remoção de substâncias lipofílicas, purificando o extrato final (HENRIQUES *et al.*, 2003).

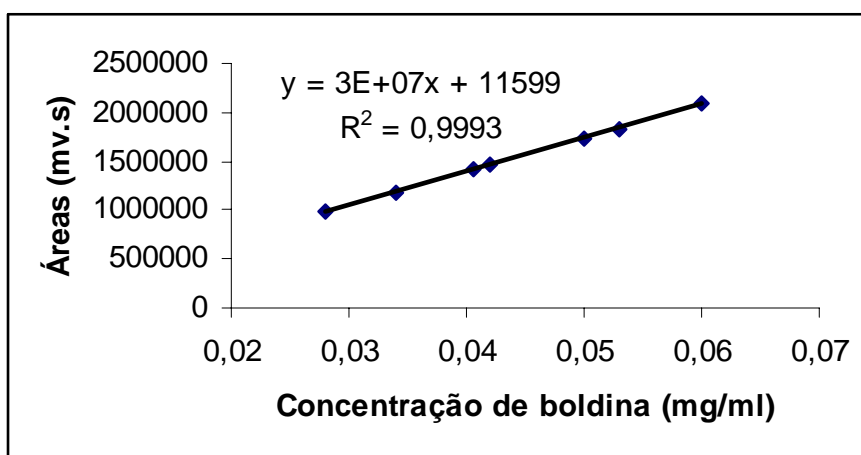
STÉVIGNY e colaboradores (2004) relataram uma melhor eficiência de extração dos alcalóides aporfínicos de diferentes amostras de *Cassytha filiformis*, comparando a extração em banho de água a 50° C, com maceração, extração em Soxhlet e percolação. Além disso, observaram que o pH da solução extrativa deve estar entre 8,5 - 9,5 para uma completa extração dos alcalóides.

Na curva padrão para o método por CLAE foram utilizadas soluções de boldina na faixa de concentração de 0,028 mg/ml a 0,6 mg/ml. A Tabela 4.5 apresenta as áreas absolutas dos picos obtidos nas diferentes concentrações. A equação da reta obtida por regressão linear e o coeficiente de regressão para o padrão podem ser visualizados na Figura 4.3.

**Tabela 4.6** Áreas absolutas dos picos de boldina obtidas por CLAE.

Concentração (mg/ml)*	Área (mV.s) média ± D.P.	DPR %
0,028	983161 ± 23291,46	2,37
0,034	1173399 ± 12306,67	1,05
0,040	1411776 ± 33582,22	2,38
0,042	1477510 ± 11166,97	0,75
0,050	1729448 ± 10117,02	0,58
0,053	1833321 ± 15360,61	0,84
0,060	2089331 ± 26958,52	1,29

\* todas as análises ocorreram em triplicata.



**Figura 4.3** Curva padrão da boldina obtida por CLAE

Na Tabela 4.7 são mostradas os dados da análise de variância (ANOVA).

**Tabela 4.7** Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão da boldina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fcalc
Entre	6	$2,66 \times 10^{12}$	$4,43 \times 10^{11}$	535,02*
Dentro	14	$1,16 \times 10^{10}$	$8,28 \times 10^8$	
Total	20	$2,67 \times 10^{12}$		

\* significativo para  $p < 0,01$

A partir dos dados com a análise de variância constata-se que a mesma apresenta diferenças significativas entre as diluições, regressão linear ( $p < 0,01$ ) e desvio da linearidade não significativo.

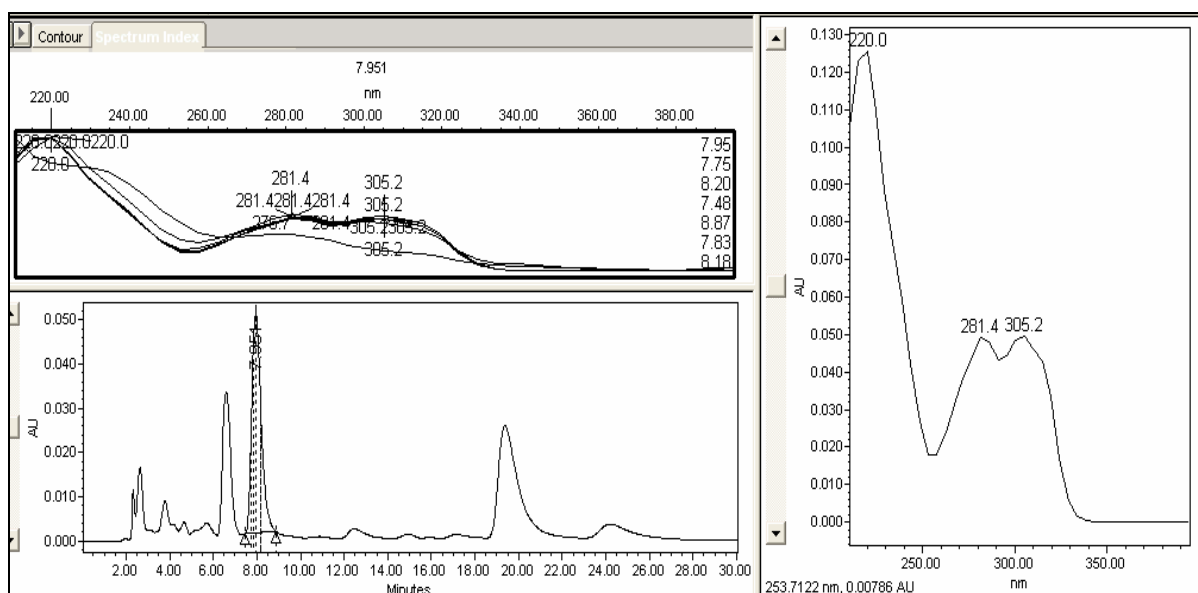
#### 4.4.3 Validação do método analítico

As soluções extrativas utilizadas no processo de validação do método foram preparadas conforme item 4.3.3.1.

##### 4.4.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi comprovada pela análise da pureza do pico verificada nos cromatogramas obtidos, utilizando cromatógrafo com detector de arranjo de fotodiodos.

A Figura 4.4 apresenta o cromatograma obtido com o respectivo espectro de absorção do pico da boldina na região do ultravioleta (305 nm) e ausência de impurezas em diferentes regiões.

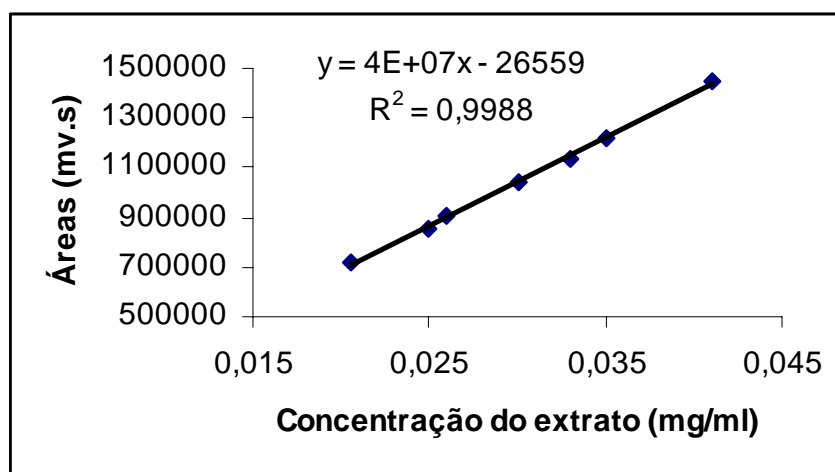


**Figura 4.4** Cromatograma demonstrando a especificidade do método em relação à boldina.

##### 4.4.3.2 Linearidade

O valor do coeficiente de regressão, o gráfico da linearidade e a equação da reta estão apresentados na Figura 4.5.





**Figura 4.5** Curva de linearidade apresentando a equação da reta e o coeficiente de regressão da amostra de *Peumus boldus*.

A Tabela 4.7 apresenta a análise de variância do estudo de linearidade. Verificou-se a manutenção da integridade do pico da boldina, sendo que os resultados demonstram, ainda, regressão significativa ( $p < 0,01$ ) e ausência de desvios de linearidade.

**Tabela 4.8** Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade de *Peumus boldus*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fcalc
Entre	6	$1,08 \times 10^{12}$	$1,81 \times 10^{11}$	112,47*
Dentro	14	$2,24 \times 10^{10}$	$1,61 \times 10^8$	
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b><math>1,11 \times 10^{12}</math></b>		

\* significativo para  $p < 0,01$

#### 4.4.3.3 Precisão

A precisão do método foi analisada com as determinações de repetibilidade e precisão intermediária (intra e entre-dias) da solução extrativa. A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos nesta análise.

**Tabela 4.9** Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária de *Peumus boldus*.

	<b>Concentração de boldina (g%) ± DP</b>	<b>DPR%</b>
<b>Repetibilidade*</b>	0,0168 ± 0,00005	0,29
<b>Precisão intra-dia</b>		
Dia 1	0,0196 ± 0,00033	1,68
Dia 2	0,0197 ± 0,00036	1,82
Dia 3	0,0198 ± 0,00023	1,16
Dia 4	0,0197 ± 0,00044	2,23
Dia 5	0,0196 ± 0,00036	1,84
<b>Precisão inter-dias</b>	0,0197 ± 0,00031	1,57

\* Resultados da média de seis diluições, cada uma injetada em triplicata.

Analisando os resultados obtidos, percebeu-se que o método demonstra boa precisão em suas análises, visto que os valores de DPR estão abaixo do limite estabelecido para matrizes complexas de 5% (BRASIL, 2003).

#### 4.4.3.4 Exatidão

Para a realização do teste de recuperação, uma faixa de concentração específica foi estabelecida e quantidades do padrão de boldina foram adicionados. Estes valores estão especificados na Tabela 4.9, que mostra, ainda, o teor de boldina recuperada que foi calculada com a utilização da Equação 4.1.

**Tabela 4.10** Resultados da análise de exatidão para a amostra de *Peumus boldus*.

<b>Amostras *</b>	<b>Concentração</b>		<b>Recuperação (%)</b>	<b>Média (%)</b>
	<b>Adicionada (mg/ml)</b>	<b>Recuperada (mg/ml)</b>		
<b>1</b>	0,0103	0,0092	89,8	97,2
<b>2</b>	0,0125	0,0115	92,3	
<b>3</b>	0,0130	0,0143	109,7	

\* n=3

O teor médio de boldina recuperado na análise por CLAE foi de 97,2%, demonstrando a exatidão do método analítico.

#### 4.4.3.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a boldina foram obtidos com a utilização da média dos coeficientes de regressão linear (11598,53) e com o desvio padrão médio dos interceptos (18065,94), calculados com a Equação 4.2.

Os resultados obtidos foram: LD = 1,72 µg/ml e LQ = 5,23 µg/ml. Estes valores baixos de LD e LQ demonstram a boa sensibilidade do método analítico desenvolvido.

#### 4.4.3.5 Robustez

Os resultados do teste de robustez constam na Tabela 4.10.

**Tabela 4.11** Avaliação do parâmetro de robustez por CLAE para *Peumus boldus*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Teor médio (g%) ± DP</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>Coluna cromatográfica</b>	8,384	0,022 ± 0,00075	3,41
<b>Fluxo</b>	5,688	0,023 ± 0,00108	4,70
<b>Fase móvel</b>	4,0730	0,022 ± 0,00006	0,27

As mudanças estabelecidas neste teste não alteraram de forma significativa o cromatograma da amostra. Pode-se observar que os valores de boldina encontrados na análise de robustez foram semelhantes aos encontrados no teste de precisão, e que maiores variações ocorreram somente no tempo de retenção do pico de interesse.

O método desenvolvido mostrou características de *performance* apropriadas, sendo adequadas para a análise de boldina em amostras de folhas de *Peumus boldus*. Com o método validado, torna-se possível garantir a confiabilidade nos resultados.

**5. QUANTIFICAÇÃO DE BOLDINA**

***EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE *Peumus boldus****

---

---

## 5.1 INTRODUÇÃO

Cada país possui um conjunto de regras que regula a produção e a comercialização de drogas vegetais. No Brasil, a regulamentação para a comercialização de fitoterápicos é regida por legislação específica. A RDC nº 48 (BRASIL, 2004) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e a Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1996) traz monografias para algumas espécies vegetais, que contém critérios definidos para identidade, pureza e teor de constituintes químicos (CALIXTO, 2000; MELO *et al.*, 2004).

Embora dispositivos legais que regem a aplicação das normas difiram de país para país, o objetivo final em todos os casos é o mesmo: fazer com que um produto oferecido como substância medicamentosa satisfaça um padrão de qualidade, enquadrando-se nas exigências da monografia, quando analisado pelos métodos preconizados pela Farmacopéia (SHARAPIN, 2000).

O processo de avaliação da qualidade de uma droga ou de uma planta fresca usada como matéria-prima deve compreender a determinação de três características principais: a autenticidade, a integridade e a pureza do material a ser examinado (MATOS, 1995).

A segunda etapa do processo, ou seja, a determinação da integridade de uma droga é feita somente sobre o material considerado autêntico, especialmente a droga. Nesta prova busca-se determinar possíveis perdas de uma ou mais de suas propriedades químicas e biológicas. Nesta determinação estão incluídas as técnicas de doseamento de princípios ativos ou de outros componentes característicos (MATOS, 1995).

Conforme a RDC nº 48, o princípio ativo é a substância, ou classes químicas (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.), quimicamente caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico. E o marcador, componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico que é utilizado como referência no

controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004).

O teor de componentes ativos abaixo do prescrito indica baixa qualidade da matéria-prima vegetal. Quando se trata da utilização da droga vegetal para isolamento de substâncias naturais puras, o problema resume-se ao menor rendimento e, eventualmente, à dificuldades adicionais no processo de isolamento, em função da natureza e teor mais elevado de componentes secundários. Entretanto, quando a matéria-prima vegetal destina-se à fabricação de extratos, tinturas e/ou preparações fitofarmacêuticas, o problema assume maior gravidade visto que a proporção entre componentes ativos e inativos estará alterada (SHARAPIN, 2000).

Outro problema freqüentemente encontrado refere-se a adulterações da matéria-prima vegetal, em maior ou menor grau. As substituições são geralmente justificadas pela dificuldade de se obter a espécie oficial (SHARAPIN, 2000). No Brasil, a espécie *Plectranthus barbatus* Andrews é utilizada como adulteração ao *Peumus boldus*, e é conhecida popularmente como falso-boldo ou boldo-brasileiro. O ensaio farmacológico do extrato aquoso das folhas de *Plectranthus barbatus* mostrou ação hipossecretora gástrica em ratos, diminuindo não só o volume de suco gástrico como a sua acidez. Embora o uso popular desta planta possa ser justificado pela comprovação experimental da atividade hipossecretora gástrica, ainda não se conhecem seus princípios ativos responsáveis por esta ação (LAPA *et al*, 1991). Sabe-se que apenas a espécie *Peumus boldus* possui o alcalóide boldina.

A escolha do método de determinação quantitativa dos princípios ativos destina-se a assegurar qualidade adequada ao produto. Muitas vezes a escolha recai sobre um método não específico, de fácil execução, mas cuja precisão é elevada. Nos casos em que as impurezas não são determinadas com facilidade, métodos como a CLAE podem ser prescritos (SHARAPIN, 2000).

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar o teor de boldina em amostras comerciais de *Peumus boldus*.

## 5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.3.1 Material vegetal

As amostras de *Peumus boldus* adquiridas na indústria ou comércio dos países do Brasil, Chile e Argentina estão apresentadas na Tabela 5.1. Todas as amostras adquiridas no comércio estavam embaladas em sachets, dentro de caixas de papel e vedadas com papel celofane, exceto a amostra adquirida em Manaus.

**Tabela 5.1** Listagem das amostras industriais e comerciais de *Peumus boldus*.

Nº	Local de obtenção	Ano
1	Ind. farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	2004
2	Ind. farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	2004
3	Ervanário (Manaus – Brasil)	2004
4	Comércio (Santiago - Chile)	2004
5	Comércio (Buenos Aires - Argentina)	2004
6	Comércio (Santiago - Chile)	2005
7	Comércio (Porto Alegre – Brasil)	2004
8	Comércio (Porto Alegre - Brasil)	2004
9	Comércio (Buenos Aires - Argentina)	2004
10	Comércio (Buenos Aires - Argentina)	2005

### 5.3.2 Análise quantitativa

Os extratos foram preparados conforme especificado no item 4.3.3.1, analisados segundo o item 4.3.3.2 e de acordo com as condições preconizadas em 4.3.3.3. Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra.

Os teores foram obtidos com utilização da equação da reta da curva padrão de boldina apresentada na Figura 4.3.

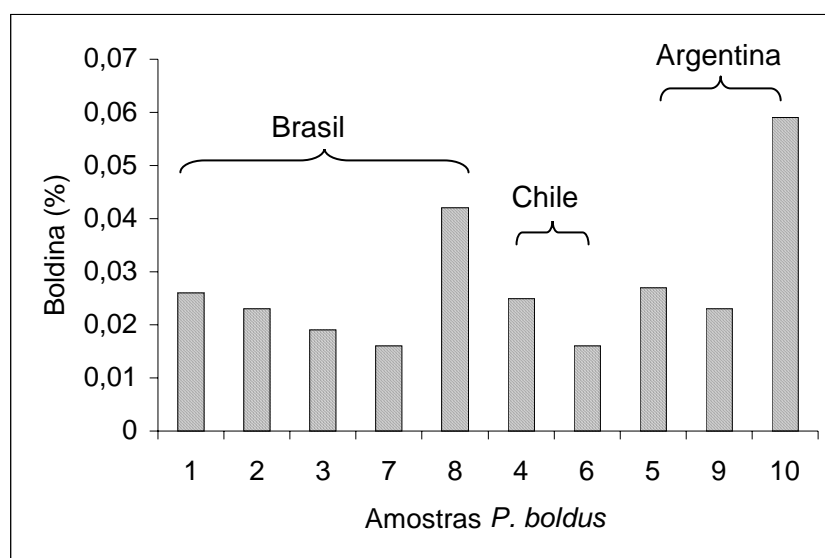
## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 5.2 mostra os teores médios de boldina obtidos na análise das dez amostras industriais e comerciais.

**Tabela 5.2** Teores médios de boldina encontrados nas amostras de *Peumus boldus*.

Amostra	Concentração boldina (g% ± DP)	DPR (%)
1	0,026 ± 0,000505	2,29
2	0,023 ± 0,002406	10,6
3	0,019 ± 0,001569	8,25
4	0,025 ± 0,000927	3,71
5	0,027 ± 0,001435	5,31
6	0,016 ± 0,000522	3,16
7	0,016 ± 0,000326	1,97
8	0,042 ± 0,001272	3,04
9	0,023 ± 0,000316	1,37
10	0,059 ± 0,000809	1,38

A Figura 5.1 compara as concentrações de boldina encontradas nas amostras dos três países.



**Figura 5.1** Análise do teor de boldina encontrada em amostras de *Peumus boldus* do Brasil, Chile e Argentina.

Nota-se que a concentração de boldina nas amostras obtidas no Brasil variou de 0,016 % na amostra 7 a 0,042 % na amostra 8, que por sua vez foi a única amostra analisada com prazo de validade vencido. Comparando-se estatisticamente a menor e a maior concentração encontradas, observa-se que não houve diferença significativa ( $t_{\text{calc}} = 0,2507$ ;  $t_{\text{tab}} = 2,093$ ). Além disso a amostra obtida de um ervateiro em Manaus obteve um teor de boldina de 0,019%, pouco superior ao menor valor encontrado.



As amostras chilenas tiveram teores médios de 0,016 % na amostra 6 e 0,025% na amostra 4, e estatisticamente também não apresentaram diferenças significativas ( $t_{\text{calc}} = 1,1396$ ;  $t_{\text{tab}} = 2,069$ ).

Por fim, as amostras argentinas apresentaram teores médios que variaram de 0,023 % na amostra 9 a 0,059 % na amostra 10. Esta foi a amostra com o mais alto teor de boldina encontrado. A análise estatística comparativa entre a menor e maior concentração de boldina encontrada, mostra que para estas amostras houve diferença significativa entre os valores encontrados ( $t_{\text{calc}} = 12,07$ ;  $t_{\text{tab}} = 2,093$ ).

A Tabela 5.3 apresenta os dados das médias de teores de boldina encontradas entre os três países e o desvio padrão relativo obtido para cada um deles.

**Tabela 5.3** Médias das concentrações de boldina obtidas nos três países.

<b>Amostras</b>	<b>Teor médio de boldina (%) <math>\pm</math> DP</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>Brasil</b>	0,0244 $\pm$ 0,010212	41,85
<b>Chile</b>	0,0205 $\pm$ 0,006364	31,04
<b>Argentina</b>	0,0363 $\pm$ 0,019761	54,31
<b>Média geral</b>	0,0272 $\pm$ 0,013398	49,26

Observa-se que os desvios padrão relativos obtidos foram muito elevados, mostrando a diversidade entre os valores encontrados para os três países. Apesar disso, percebe-se que amostras obtidas em países diferentes e produzidas pelo mesmo fabricante tiveram concentrações de boldina muito semelhantes. Este é o caso das amostras 4 (Chilena) e 5 (Argentina) com teores de 0,025% e 0,027% respectivamente; e das amostras 6 (Chilena) e 7 (Brasileira), ambas com valores de 0,016% de boldina, sendo esta, a marca com menor teor encontrado.

*Peumus boldus* é uma planta originária e cultivada no Chile, podendo ser encontrada também na Argentina. Sabe-se que todas as distribuidoras de plantas medicinais no Brasil importam as suas folhas. Porém, fatores já anteriormente citados, como a procedência do material, bem como os fatores externos: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem e transporte, parte da planta usada, entre outros, podem interferir na composição química e pureza das amostras, explicando a variação entre as amostras analisadas (CALIXTO, 2001; FARIAS *et al.*, 2003).

## **6. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA**

---

## 6.1 INTRODUÇÃO

Garantir a qualidade de um medicamento é, também, garantir a eficácia e segurança durante sua vida útil, desta forma, as avaliações de estabilidade de produtos farmacêuticos são necessárias para que se possa assegurar as características terapêuticas adequadas ao produto até o seu uso, bem como, estabelecer seu prazo de validade (GRIMM, 1987).

Uma droga deteriorada com o tempo pode ter efeitos tóxicos, portanto, ser perigosa ao paciente. Pode também constituir uma fraude se não cumprir com as especificações de identidade, efetividade, potência, pureza e inocuidade requeridas (NUDELMAN, 1975).

As reações de degradação de medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de vários fatores como temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, mudanças de pH, interações, contaminação microbiana, etc. Sendo assim, todos os métodos para estudo da estabilidade devem levar em conta estes fatores (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

Portanto, a estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o fármaco mantém sua integridade em termos de quantidade e identidade química, sem ser alterado pelos fatores citados acima (BILIA *et al.*, 2001).

Todos os métodos aplicáveis à predição de um período útil têm uma base físico-química, já que a degradação compreende uma ou mais reações cuja velocidade pode ser calculada cineticamente. Assim, a cinética é uma disciplina fundamental para o estudo da estabilidade de produtos farmacêuticos (NUDELMAN, 1975).

Regulamentos para os estudos de estabilidade são definidos em muitos guias (WHO, 1996; ICH, 2003; MERCOSUL, 1996; BRASIL, 2005), sendo que drogas de origem vegetal e preparações de origem vegetal obedecem aos mesmos regulamentos oficiais de medicamentos químicos (HEIGL & FRANZ, 2003).

Estes órgãos regulamentadores classificam estes estudos de estabilidade em estudos de longa duração, que são validações dos experimentos em relação às

características físicas, químicas e biológicas do medicamento, durante e depois do prazo de validade esperado; e estudos de estabilidade acelerada, destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (WHO, 1996; ICH, 2003; MERCOSUL, 1996; BRASIL, 2005).

Os objetivos destes testes acelerados podem ser definidos como:

1. A rápida detecção da deterioração em diferentes formulações iniciais do mesmo produto, o que é usado na seleção da melhor forma de formulação de uma série de possíveis escolhas.
2. A predição do prazo em que o produto permanecerá válido para uso, quando armazenado sob condições esperadas ou especificadas de armazenamento.
3. O fornecimento de um modo rápido de controle de qualidade, o qual assegura que nenhuma alteração inesperada ocorreu no produto armazenado (AULTON, 2005).

Conforme a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996) e ICH (2003) os testes de estabilidade devem considerar as zonas climáticas onde o produto está sendo comercializado. Estas zonas são espaços geograficamente delimitados de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicável quando da realização dos estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

O Brasil está situado na zona climática IV (quente/úmida) onde as condições de temperatura e umidade relativa estabelecidas são de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$ , em estudo acelerado com duração de seis meses; ou  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  em estudo de longa duração de vinte e quatro meses (condições preconizadas para substâncias sólidas ou semi-sólidas). Além desta zona, outras três são definidas: zona I (clima temperado), zona II (mediterrâneo) e zona III (quente e seco), as quais possuem temperaturas de análise e umidade relativa mais baixas que as consideradas na zona IV (WHO, 1996; BRASIL, 2005).

A maioria dos métodos de doseamento descritos nas monografias oficiais não são adequados para a determinação da estabilidade dos fármacos, isto é, o doseamento não é capaz de diferenciar o fármaco intacto dos seus produtos de degradação, não sendo específico para a substância ativa. Quase todos os ensaios de estabilidade dos novos fármacos desenvolvidos recorrem à CLAE como método analítico de preferência para análise de estabilidade, pois além de separar e quantificar a substância ativa, também detecta o surgimento de novos compostos originados pela degradação (LACHMAN *et al.*, 2001).

## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a estabilidade química acelerada de *Peumus boldus* analisando os resultados cineticamente, definindo desta maneira:

- a. a ordem de reação;
- b. a velocidade de degradação (k);
- c. o tempo em que a concentração de boldina é 90% da inicial ( $t_{90\%}$ );
- d. o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ).

## 6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado no estudo de estabilidade foi obtido de uma indústria farmacêutica de Porto Alegre no ano de 2004 (mesmo material utilizado na análise quantitativa da droga).

### 6.3.2 Condições do estudo

Em torno de 10 g de folhas dessecadas de *Peumus boldus* foram submetidas à análise em triplicata, dispostas em embalagens de papel, em câmara climática Nova Ética modelo 420LCD, com controle de temperatura e umidade ( $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{ U.R.}$ ) durante um período de 180 dias, de acordo com as condições preconizadas pela Resolução nº 01 de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005).

As amostragens ocorreram nos tempos 0 (P0: sem ação de temperatura e umidade), 30 dias (P1), 60 dias (P2), 90 dias (P3) e 180 dias (P4), pois no início do estudo a legislação vigente (Resolução RE nº 560 de 02 de abril de 2002) (BRASIL, 2002) previa esta freqüência de testes no ensaio de estabilidade acelerada. A partir de 29 de julho de 2005 entrou em vigor a Resolução RE nº 1 (BRASIL, 2005) que preconiza as mesmas condições de armazenagem, porém a freqüência dos testes passou para 0, 90 e 180 dias.

### **6.3.3 Análise quantitativa**

A amostra pulverizada referente a cada amostragem foi dividida em três partes, gerando três soluções extrativas preparadas conforme item 4.3.3.1. Três diluições foram preparadas para cada amostra, filtradas em membrana em PVDF (0,45  $\mu\text{m}$ ) e injetadas em triplicata utilizando o método cromatográfico validado descrito na Tabela 4.1.

### **6.3.4 Cálculos da velocidade de degradação (k), dos tempos de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ )**

A partir dos dados obtidos com a análise dos coeficientes de correlação, calculados através de regressão linear, pode-se identificar a ordem da reação, e a partir desta calcular a velocidade de degradação (k), tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) com a utilização de equações pertinentes a cada ordem.

## **6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

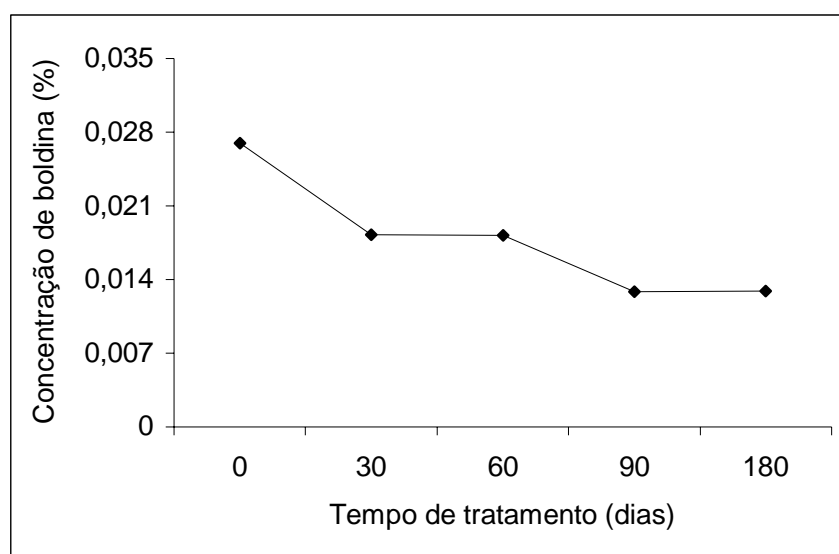
Os resultados obtidos na análise quantitativa de boldina nas soluções extrativas das amostras submetidas ao estudo de estabilidade encontram-se descritos na Tabela 6.1. A Figura 6.1 mostra o decaimento na concentração de boldina nos tempos de análise.

**Tabela 6.1** Análise de estabilidade acelerada de *Peumus boldus*.

Amostras	Áreas médias	Concentração boldina (%) $\pm$ DP	DPR (%)
P0*	1637468	0,02696 $\pm$ 0,000729	2,70
P1**	1551222	0,01824 $\pm$ 0,000432	2,37
P2**	1579515	0,01821 $\pm$ 0,000595	3,27
P3**	1097469	0,01287 $\pm$ 0,000420	3,26
P4**	1085306,5	0,01292 $\pm$ 0,000431	3,34

\* Fator de diluição = 10

\*\* Fator de diluição = 7,14



**Figura 6.1** Perfil do decaimento da concentração de boldina obtido a partir das análises cromatográficas das amostras provenientes do estudo de estabilidade acelerada para *Peumus boldus*.

Analisando os dados da Tabela 6.1 e da Figura 6.1 percebeu-se visível decaimento na concentração de boldina após 30 dias em câmara climática, permanecendo constante até 60 dias, tornando a decair após 90 dias e novamente mantendo os teores até os 180 dias.

A Tabela 6.2 apresenta os percentuais médios de degradação do teor de boldina, calculados em função das condições propostas de temperatura e umidade e em relação ao tempo zero, o qual não sofreu nenhuma exposição a temperaturas e umidades controladas.

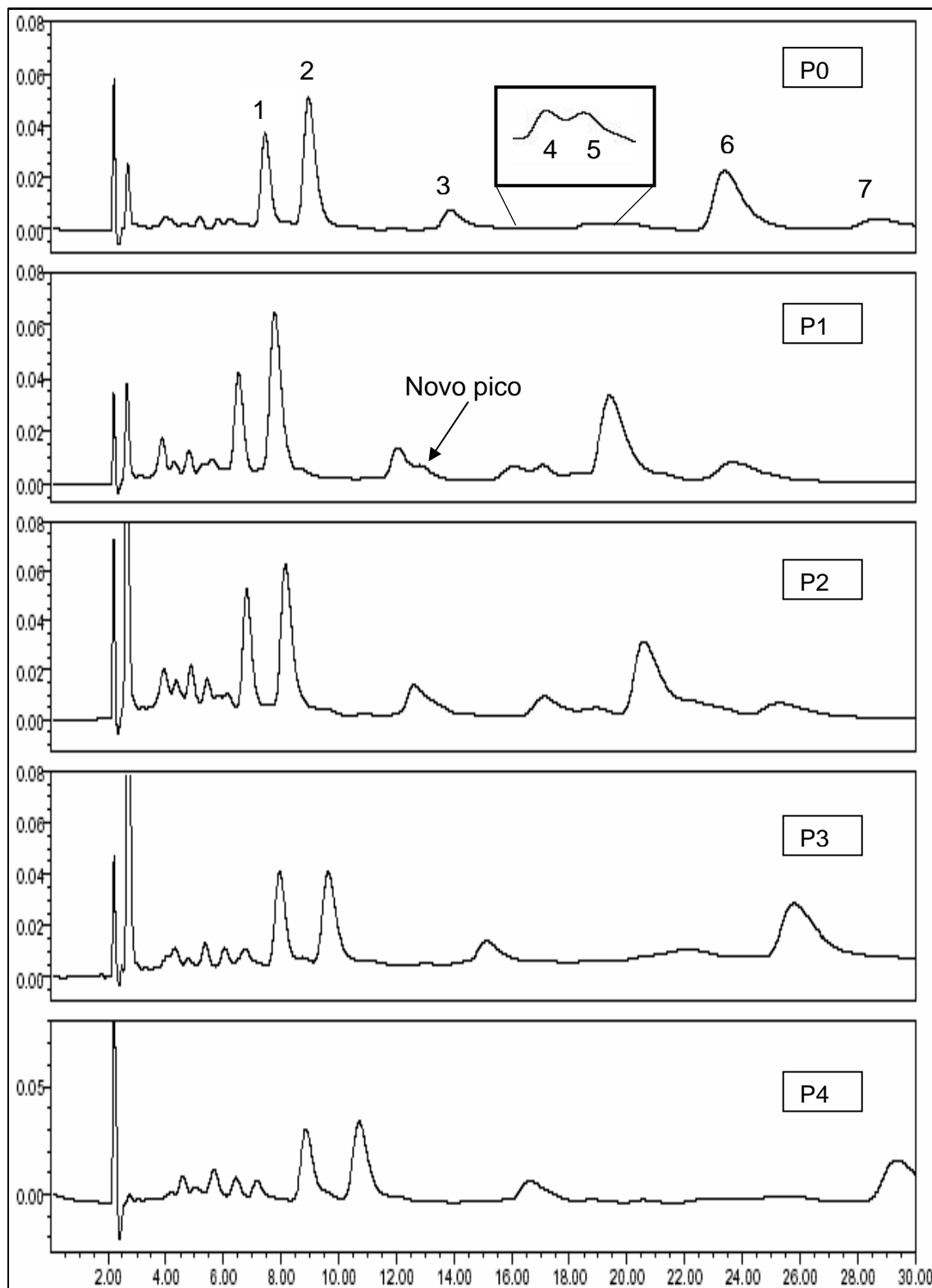
**Tabela 6.2** Percentuais médios de degradação do teor de boldina no estudo de estabilidade acelerada de *Peumus boldus*.

<b>Amostras</b>	<b>Teor de boldina (%)</b>
P0	100
P1	67,65
P2	67,54
P3	47,74
P4	47,92

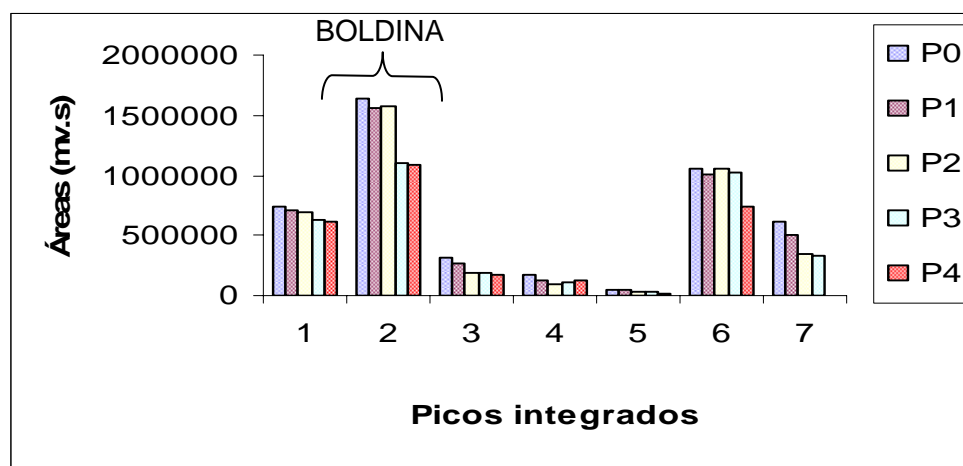
Percebe-se um decaimento abrupto de 32,35% no teor de boldina nos primeiros 30 dias de tratamento das amostras. A redução máxima percentual chega a 52,26% nos 90 dias da análise.

A Figura 6.2 apresenta os cromatogramas obtidos após a injeção das soluções extrativas referentes a cada ponto da análise. O cromatograma do ponto zero mostra os picos integrados numerados de 1 a 7. Esta numeração é válida para os outros 4 cromatogramas. A Figura 6.3 apresenta a análise das áreas médias dos picos numerados (passíveis de integração) obtidas no decorrer do estudo.





**Figura 6.2** Cromatogramas obtidos na análise de estabilidade acelerada de *Peumus boldus*.



**Figura 6.3** Análise das áreas médias dos principais picos encontrados nos cromatogramas de *Peumus boldus* na análise da estabilidade acelerada (P0 – não submetida às condições de umidade e temperatura; P1 – após 30 dias em câmara climática; P2 – após 60 dias em câmara climática; P3 – após 90 dias em câmara climática e P4 – após 180 dias em câmara climática).

O pico indicado com número 1 pode se tratar da isoboldina, um isômero da boldina que possui os mesmos máximos de absorvância na região do ultravioleta (281nm; 305 nm). Os outros picos não foram identificados, mas a análise das absorvâncias na região do ultravioleta indica que possivelmente sejam alcalóides.

Pela análise da Figura 6.3, pode-se observar o decaimento visível das áreas de todos os picos integrados. Alguns deles apresentaram um leve aumento, não significativo, em seus valores de áreas médias, como no caso do pico 4 após 90 (P3) e 180 (P4) dias de tratamento, e do pico 6 após 60 (P2) dias em câmara climática, este, no entanto, tornando a decair nos próximos meses.

Observa-se tanto na Figura 6.2 quanto na Figura 6.3 que o pico número 7 desaparece após 180 dias de tratamento (P4). Também pela Figura 6.2 é possível notar o surgimento de um novo pico entre os picos 3 e 4 após 30 (P1) dias de análise, que desaparece com 60 (P2) dias.

Porém, nenhum dos picos teve aumento significativo de suas áreas médias. Percebe-se que houve uma maior degradação de todos os picos analisados do que o surgimento ou aumento de outros.

Analisando os resultados cineticamente, conseguiu-se os valores médios dos dados obtidos para as amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada

considerando-se diferentes ordens de reação. Estes valores estão apresentados na Tabela 6.3.

**Tabela 6.3** Valores experimentais obtidos na análise de estabilidade acelerada de *Peumus boldus*, considerando-se diferentes ordens de reação.

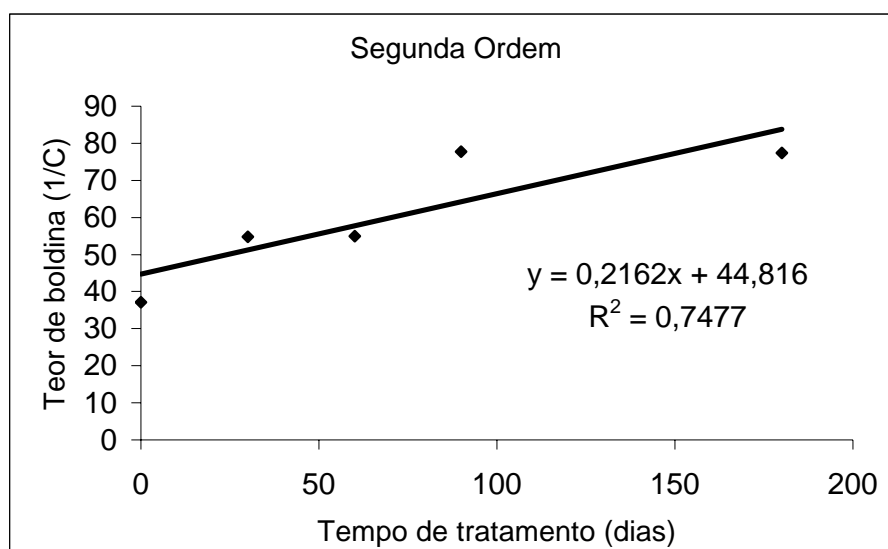
Tempo (dias)	Reação de ordem zero Teor de boldina (%) <sup>(1)</sup>	Reação de primeira ordem log C <sup>(2)</sup>	Reação de segunda ordem 1/C <sup>(3)</sup>
0	0,02696	-1,5693	37,09
30	0,01824	-1,7389	54,82
60	0,01821	-1,7396	54,91
90	0,01287	-1,8904	77,70
180	0,01292	-1,8887	77,39

<sup>(1)</sup> coeficiente de correlação (r) = 0,6678

<sup>(2)</sup> coeficiente de correlação (r) = -0,7179

<sup>(3)</sup> coeficiente de correlação (r) = 0,7477

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6.3, observou-se que a cinética de degradação da espécie *Peumus boldus* é de segunda ordem, ou seja, a velocidade de reação é proporcional a concentração dos reativos ou a segunda potência de um deles (NUDELMAN, 1975). O gráfico obtido com os valores de 1/C versus tempo (dias), bem como o coeficiente de correlação obtido estão apresentados na Figura 6.4.



**Figura 6.4** Representação gráfica, de segunda ordem, da curva de degradação da boldina.

Com os dados da Tabela 6.3 foi possível determinar a constante da velocidade de degradação (k), o tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da espécie em estudo, com utilização de equações de segunda ordem.

**Equação 6.1** Equações de segunda ordem usadas no cálculo da velocidade de degradação (k), tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ).

$$k = 1/t (1/C - 1/Co)$$

$$t_{90\%} = 1/ (9k \cdot Co)$$

$$t_{1/2} = 1/k \cdot Co$$

Onde : k = constante de velocidade de reação

t = tempo em dias

C = concentração da substância ativa no tempo "t"

Co = concentração inicial da substância ativa

A constante de velocidade de degradação (k) encontrada foi de 0,2236 dias<sup>-1</sup>. O tempo para que o marcador reduza sua concentração inicial em 10% é de aproximadamente 18 dias, e o tempo de meia-vida é de aproximadamente 165 dias.

**7. QUANTIFICAÇÃO DE METAIS PESADOS  
POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

---

## 7.1 INTRODUÇÃO

A expressão “metais pesados”, mesmo sendo comumente usada, não é muito bem definida, podendo-se utilizar como sinônimos, “metais traço”, “elementos traço”, “micronutrientes”, “microelementos”, entre outros. Designa-se metal pesado o grupo de elementos que ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações e apresentam densidade igual ou acima de  $5 \text{ g/cm}^3$  (DUARTE e PASQUAL, 2000).

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais, alguns desses elementos sendo benéficos, enquanto que outros são danosos ao sistema biológico, dependendo da dose e da forma química em que se encontram (OGA, 2003).

Os metais são redistribuídos naturalmente no meio ambiente tanto por ciclos geológicos como biológicos e constituem a maior fonte poluidora inorgânica de solos e águas, sendo levados ao ambiente principalmente através de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (TAVARES e CARVALHO, 1992; KLASSEN e WATKINS III, 2001).

O solo possui uma grande capacidade de retenção de metais pesados, porém, se essa capacidade for ultrapassada, os metais em disponibilidade no meio penetram na cadeia alimentar dos organismos vivos ou são lixiviados, colocando em risco a qualidade do sistema de água subterrânea (MATOS *et al.*, 1996). Em geral, as plantas absorvem prontamente esses elementos dissolvidos nas soluções do solo, seja na forma iônica ou quelado, seja na forma de complexos (DUARTE e PASQUAL, 2000).

Assim, preparações medicinais podem conter níveis elevados de metais pesados. Isto acontece quando estes são os ingredientes ativos, como no caso do chumbo e mercúrio nas medicinas Chinesa, Mexicana e Indiana, ou quando as plantas crescem em áreas poluídas, perto de rodovias ou refinarias de minérios. Ainda, altos níveis podem ser encontrados quando recursos como fertilizantes contendo cádmio, pesticidas a base de mercúrio orgânico ou chumbo, são utilizados como recursos agrícolas (ABOU-ARAB *et al.*, 1999).

Alguns metais são considerados essenciais ao desenvolvimento de plantas ou animais, porém, os limites de tolerância a estes microelementos, de maneira geral, são muito baixos. Sabe-se que todos os elementos em concentrações elevadas podem trazer danos aos organismos, por interagirem diretamente com o DNA (KLASSEN e WATKINS III, 2001; HSU e GUO, 2002; MAIGA *et al.*, 2005). Dentre eles destacamos:

**Ferro - (Fe):** vital para a maioria dos organismos vivos é considerado um elemento em traço, ou seja, necessário na ordem de miligrama. Participa de uma série de processos metabólicos, incluindo o transporte de oxigênio, síntese de DNA e transporte de elétrons. As desordens no metabolismo do ferro estão entre as mais comuns doenças em humanos, e podem levar a manifestações clínicas diversas, como anemia e condições neurodegenerativas. As considerações toxicológicas do ferro são importantes em termos de exposições agudas acidentais (geralmente com medicamentos) e sobredoses crônicas, devido à hemocromatose idiopática, como consequência de teor excessivo de ferro na dieta ou como consequência de transfusões sanguíneas freqüentes (KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003; MAIGA *et al.*, 2005).

**Cobalto - (Co):** essencial para a formação da vitamina B12, que por sua vez é necessária para a produção de células sanguíneas vermelhas e prevenção de anemias prejudiciais. Além disso, participa da catálise de reações como a síntese de metionina, metabolismo de purinas e folatos, e a formação de ácido metilmalônico em ácido succínico. Este metal é considerado um elemento em ultratraço necessário na ordem de micrograma-nanograma, e é considerado relativamente raro, produzido principalmente como sub-produto de outros metais, principalmente o cobre. É usado em ligas de alta temperatura e em ímãs permanentes. Os seus sais são úteis como secantes de tintas, como catalisadores e na produção de numerosos pigmentos. As doenças causadas pela deficiência do metal em gados e ovelhas são caracterizadas por anemia, perda de peso e crescimento retardado. A administração excessiva desse elemento pode causar gota e reduzir a atividade tireoidiana. Exposições ao cobalto estão relacionadas ao desenvolvimento de cardiomiopatia (KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003; MAIGA *et al.*, 2005).

**Cobre - (Cu):** assim como o ferro, o cobre é considerado um elemento em traço, necessário na ordem de miligrama. É componente essencial de enzimas como a tirosinase, citocromo oxidase e superóxido dismutase, mas o íon é potencialmente tóxico devido à geração de radicais livres. Deficiências de cobre são caracterizadas por anemia hipocrômica e anemia microcítica, causadas por uma falha na síntese de hemoglobina; além disso, doenças neurológicas como Doença de Alzheimer, Doença de Prion e Doença de Wilson estão relacionadas a deficiências de cobre. A toxicidade por cobre se caracteriza pela indução de espécies reativas de oxigênio em reações do tipo Fenton causando quebras no DNA e danos à membranas e mitocôndrias (BRITO FILHO, 1988; CHUKHLOVIN *et al.*, 2001; KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003).

**Manganês - (Mn):** metal essencial considerado, assim como o ferro e o cobre, um elemento em traço, está presente em metaloproteínas como a piruvato descarboxilase, enzima citoplasmática glial e glutamina sintetase. Está presente em todos os organismos vivos, e apesar de existir na atmosfera urbana e na maioria das reservas de água, a fonte principal de exposição deriva da alimentação. Os vegetais, as partes germinais dos grãos, frutos, nozes, chás e algumas especiarias são fontes deste elemento. Deficiências de manganês produzem severas anormalidades esqueléticas e reprodutivas em mamíferos. Altas doses produzem efeitos adversos primeiramente nos pulmões e no cérebro (BRITO FILHO, 1988; CHUKHLOVIN *et al.*, 2001; KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003).

**Cromo - (Cr):** elemento geralmente abundante na crosta terrestre ocorre em estados de oxidação variando de  $Cr^{2+}$  a  $Cr^{6+}$ , mas apenas as formas trivalentes e hexavalentes têm significado biológico. O cromo trivalente é um elemento em ultratraço, necessário na ordem de micrograma-nanograma, essencial para o metabolismo do colesterol, gordura e glicose. Deficiências de cromo na dieta produzem concentrações elevadas de insulina circulante, hiperglicemia, hipercolesterolemia, elevação da gordura corporal, diminuição da contagem de espermatozoides e redução da fertilidade. O cromo hexavalente é irritante das membranas da pele e mucosas bem como um poderoso agente oxidante (BRITO FILHO, 1988; CHUKHLOVIN *et al.*, 2001; KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003).



**Níquel - (Ni):** elemento essencial para muitos animais, particularmente porque participa da regulação de lipídeos e síntese de fosfolipídeos. É considerado um elemento em ultratraço e um agente cancerígeno do trato respiratório em trabalhadores de indústrias de refinação de níquel. Exposições elevadas a este metal geralmente induzem dermatites. Estudos em animais mostraram que o níquel provavelmente esteja envolvido na ação da biotina, folato e vitamina B12. O Ni<sup>2+</sup> atravessa membranas via canal de cálcio e compete com o Ca<sup>2+</sup> por receptores intracelulares específicos (BRITO FILHO, 1988; CHUKHLOVIN *et al.*, 2001; KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003).

Outros metais são considerados exclusivamente tóxicos e possuem efeitos múltiplos em organismos à sua exposição, dentre eles destacamos o chumbo.

**Chumbo - (Pb):** conhecido por induzir várias disfunções em animais de laboratório e humanos, alterando a atividade antioxidante por inibição do grupo funcional SH em muitas enzimas, como ALAD, SOD, catalase, glutathion peroxidase e glicose-6-desidrogenase, o chumbo é considerado um microcontaminante ambiental. Seus efeitos tóxicos concentram-se geralmente no sistema renal, hematológico e sistema nervoso, atravessando a barreira placentária, com potenciais efeitos tóxicos também aos fetos. O principal meio de exposição para a população em geral são os alimentos e fontes ambientais, como tintas interiores e poeira originada de emissões industriais (BRITO FILHO, 1988; CHUKHLOVIN *et al.*, 2001; KLASSEN e WATKINS III, 2001; OGA, 2003).

O aumento da poluição ambiental por metais tóxicos e o aumento do uso de pesticidas, inclusive em cultivos de plantas medicinais têm resultado no aumento do número de amostras que apresentam resíduos de pesticidas e teores de metais pesados superiores aos limites prescritos. O risco para o consumidor é muito maior quando se trata de matéria-prima para a obtenção de extratos ou produtos fitoterápicos, que sofrem um número limitado de etapas de processamento (SHARAPIN, 2000).

O monitoramento de metais tóxicos é muito importante no desenvolvimento de países onde as plantas são usadas como alimentos ou com fins medicinais, como

o Brasil, que possui uma elevada diversidade de plantas usadas para fins farmacológicos (CALDAS e MACHADO, 2004).

O estabelecimento de limites de tolerância para esses elementos em plantas medicinais tem sido discutido. Algumas legislações consideram adequados os limites determinados para alimentos, outras, no entanto, entendem que as drogas vegetais devem seguir os mesmos critérios fixados para as demais matérias-primas farmacêuticas e medicamentos (FARIAS *et al.*, 2003).

Os ensaios limite para metais pesados estão descritos em todas as Farmacopéias, porém, os métodos de análise farmacopéica tradicionais, baseados nos ensaios limites, não são seletivos para metais pesados específicos, além de apresentarem pouca sensibilidade e baixa precisão. Metodologias como a espectrofotometria de absorção atômica, espectrometria de emissão atômica ou voltametria inversa são consideradas mais adequadas (SCHILCHER *et al. apud* FARIAS, 2003).

A Farmacopéia Britânica (BRITISH, 2004) traz a espectrofotometria de absorção atômica para determinar metais pesados em fitoterápicos e óleos essenciais e cita os seguintes elementos Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, As e Hg.

A espectrofotometria de absorção atômica é um método de alta sensibilidade para o doseamento de átomos, íons ou complexos iônicos de elementos metálicos. Compreende a medida da intensidade da luz absorvida em dado comprimento de onda pelos átomos na promoção eletrônica ao estado excitado, ao serem atomizados em uma fonte de energia, que pode ser uma corrente elétrica ou chama. Se o processo de absorção é efetuado em chama sob condições controladas e reprodutíveis, a absorvância é proporcional à concentração do elemento dosado, permitindo o estabelecimento de retas de calibração que, por sua vez, permitem a quantificação de uma amostra contendo determinado elemento (FARMACOPÉIA, 1988).

## **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Quantificar o teor dos microelementos Fe, Mn, Cu, Pb, Cr, Co e Ni em amostras industriais e comerciais de *Peumus boldus*.

## 7.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.3.1 Material vegetal

As amostras de *Peumus boldus* utilizadas na quantificação de metais pesados estão apresentadas na Tabela 7.1.

**Tabela 7.1** Listagem das amostras de *Peumus boldus* utilizadas na quantificação de metais pesados.

Nº	Quantidade (mg)	Local de obtenção	Ano
1	22,8	Ind. farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	2004
2	21,6	Ervanário (Manaus – Brasil)	2004
3	24,5	Indústria farmacêutica (Porto Alegre - Brasil)	2004
4	21,5	Comércio (Buenos Aires – Argentina)	2004
5	19,4	Comércio (Buenos Aires – Argentina)	2004
6	20,4	Comércio (Porto Alegre – Brasil)	2005
7	23,0	Comércio (Santiago – Chile)	2004
8	25,3	Comércio (Santiago – Chile)	2004

### 7.3.2 Preparação das curvas padrão

Para a preparação das curvas padrão, diluições foram efetuadas a partir de uma solução estoque de cada metal na concentração de 1 mg/ml (MERCK). Assim, obteve-se sete curvas de calibração cujas concentrações estão especificadas na Tabela 7.2. Todas as concentrações das curvas foram analisadas em triplicata, sendo que as curvas foram preparadas no mesmo dia da análise.

**Tabela 7.2** Concentrações das curvas padrão obtidas para cada metal pesquisado.

Metal	Concentrações da curva padrão (ppb)
Fe	25, 50, 100 e 200
Mn	15, 45 e 60
Cu	50, 100 e 200
Pb	15, 45 e 60
Cr	15, 45 e 60
Co	15, 45 e 60
Ni	25, 50 e 100

### **7.3.3 Preparação das amostras**

As amostras foram pesadas em balança analítica diretamente em tubos tipo eppendorf de 2 ml e as quantidades estão especificadas na Tabela 6.2. Neste tubo, adicionou-se 1 ml de ácido nítrico P.A. previamente bidestilado para retirada de qualquer impureza inorgânica, e este então foi levado a banho de ultra-som durante 30 minutos e após deixado em estufa (60°C) durante uma hora. Todo este procedimento leva à digestão da amostra. Esta solução sobrenadante é, por fim, diluída em água ultrapura até abranger as concentrações da curva padrão. Três diluições foram preparadas e analisadas para cada amostra. Os metais foram quantificados a partir das curvas de calibração preparadas.

### **7.3.4 Preparação do branco**

O branco consistiu em uma mistura de água ultrapura e ácido nítrico P.A. previamente bidestilado.

### **7.3.5 Quantificação por espectrofotometria de absorção atômica**

As concentrações dos elementos foram determinadas em um aparelho Espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer AAnalyst – 300, equipado com forno de grafite HGA – 800 e amostrador AS – 70. Foram utilizadas lâmpadas monoelemento de cátodo oco para as análises.

As análises deste capítulo foram realizadas pelo Bolsista PIBIC/UFRGS Jéferson José Ferreira.

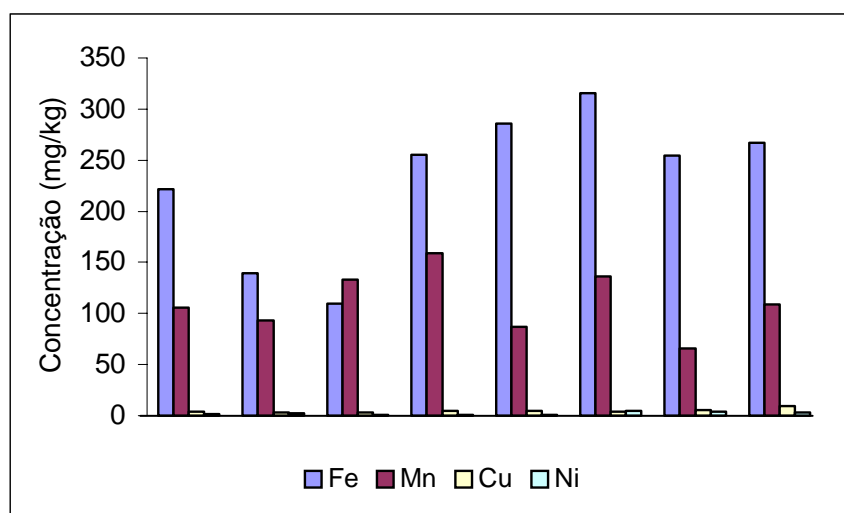
## **7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As concentrações de metais encontradas nas amostras de *Peumus boldus* estão apresentadas na Tabela 7.3 e Figura 7.1.

**Tabela 7.3** Concentrações médias dos metais nas amostras de *Peumus boldus*.

Amostra	Fe*	Mn*	Cu*	Ni*	Co**	Cr**	Pb**
1	221,5	105,9	3,75	1,30			
2	139,4	93,5	3,10	2,10			
3	109,7	133,0	3,04	1,10			
4	255,6	158,8	4,32	0,98	< 5	< 5	< 5
5	285,5	87,3	4,39	0,77			
6	315,7	136,3	3,74	4,31			
7	254,1	65,5	5,59	3,83			
8	267,2	108,5	9,16	3,46			

\* mg/kg \*\* µg/g



**Figura 7.1** Comparação dos metais presentes em diferentes amostras de *Peumus boldus*.

A técnica de digestão de amostras orgânicas na determinação de metais em traço ou ultratraço exerce influência significativa no resultado das análises, sendo que o processo utilizado neste trabalho é sugerido como um dos mais seguros (BORDAJANDI *et al.*, 2004; COCCHI *et al.*, 2004; MAIGA *et al.*, 2005).

A concentração de metais pesados neste estudo decresceu na ordem de Fe > Mn > Cu > Ni, sendo que Pb, Cr e Co tiveram níveis de quantificação abaixo do limite de detecção de 5 µg/g.

Todas as amostras apresentaram níveis mais elevados de Fe, que variaram de 109,7 mg/kg a 315,7 mg/kg. O limite tolerável de Fe, segundo MAIGA e colaboradores (2005) é de 45 mg. Isto corresponderia a aproximadamente 142 g de folhas de *Peumus boldus* da amostra 6, ou 410 g de folhas da amostra 3, ambas amostras obtidas no Brasil.

O Mn foi o segundo microelemento de maior concentração quantificado nas amostras. Seus níveis variaram de 158,8 mg/kg a 65,5 mg/kg. A recomendação diária de Mn na dieta é de 2 a 5 mg de  $Mn^{2+}$ , correspondendo a aproximadamente, 12,59 g a 31,48 g da amostra 4; e 30,53 g a 76,34 g da amostra 7 (MAIGA *et al.*, 2005).

As folhas de *Peumus boldus* são encontradas a venda no comércio, na maioria das vezes, na forma de chás acondicionados em saquinhos. Estes saquinhos contém, em média, 1,5 g de folhas rasuradas.

Os níveis de Cu variaram de 9,16 mg/kg a 3,04 mg/kg. Todos os valores encontrados ficaram abaixo do limite permitido pela OMS em alimentos, que é de 4 mg/100 g. Conforme Portaria 685 da ANVISA (1998), os níveis toleráveis de Cu em alimentos variam de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg. Nenhum dos valores obtidos na análise fica abaixo do nível de 0,1 mg/kg, no entanto, este limite corresponde a óleos, gorduras e emulsões refinadas (BRASIL, 1998; MAIGA *et al.*, 2005).

Os níveis de Ni variaram de 4,31 mg/kg a 0,77 mg/kg. Estes valores encontrados não ultrapassam a recomendação diária deste metal para crianças lactentes, que é de 5 a 15  $\mu\text{g/g}$  de Ni por dia no leite (BARCELOUX, 1999).

Os microelementos Pb, Cr e Co tiveram níveis de detecção abaixo de 5  $\mu\text{g/g}$ . Conforme a OMS, o limite máximo permitido para alimentos de chumbo é de 10  $\mu\text{g/g}$ , enquanto que a Portaria 685 da ANVISA (1998) tolera limites de 0,05 mg/kg a 2,0 mg/kg. A Farmacopéia Européia indica um limite máximo de chumbo em plantas medicinais de 5 mg/kg. Para o cromo a recomendação diária prescrita no FDA para alimentos é de 0,12 mg/kg (HAIDER *et al.*, 2004; BRASIL, 1998; EUROPEAN, 2002).

Plantas absorvem íons metálicos do solo através das raízes. O aumento da concentração de metais por plantas é influenciado por vários fatores, incluindo práticas na agricultura, condições geoclimáticas, atividades antropogênicas tais como indústrias químicas, espécie da planta e a parte usada (ABOU-ARAB *et al.*, 1999; CALDAS *et al.*, 2004; MAIGA *et al.*, 2005). Metais pesados, principalmente o Pb, são muito densos e solúveis em água, desta forma são facilmente absorvidos por organismos vivos (HAIDER *et al.*, 2004).

PALMIERI e colaboradores (2005) sugeriram que metais como o Pb são expostos no ambiente através de deposição aérea ao longo de rodovias, em proporção a densidade do tráfego, enquanto o Cu é acumulado por plantas particularmente pelo solo e seu conteúdo não está relacionado ao volume de tráfego.

Todas as amostras analisadas tiveram teores dos metais pesquisados abaixo do recomendado ou indicado. Pode-se observar que não houve relação entre as maiores concentrações encontradas de metais pesados e os mais altos teores de boldina quantificados nas amostras onde as duas análises puderam ser realizadas.





## DISCUSSÃO GERAL

A utilização cada vez mais difundida da medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde envolvendo o uso de plantas medicinais, e a conseqüente maior entrada de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos no mercado brasileiro, tem tornado mais claro, ainda, a necessidade de se buscar parâmetros para o controle de qualidade destes produtos.

Os avanços crescentes assumidos pelas técnicas analíticas de controle de qualidade têm contribuído muito para a padronização e a estabilização de matérias-primas vegetais, estas, que podem sofrer inúmeras variações no conteúdo de princípios ativos, sob a influência de diversos fatores, como: clima, solo, transporte, armazenamento e muitos outros.

O controle de qualidade das plantas medicinais deve ser aplicado desde o momento de sua coleta, identificando corretamente a espécie a ser utilizada e respeitando os períodos mais adequados da evolução da planta, de acordo com estudos prévios, para garantir, desta forma, os teores adequados de princípios ativos.

*Peumus boldus* é uma planta importada pelo mercado brasileiro, que possui ampla utilização pela população em geral e é muito confundida com a espécie brasileira *Plectranthus barbatus*. Desta forma, a análise botânica e os parâmetros de qualidade propostos neste trabalho, tornam-se muito relevantes.

A análise botânica da espécie apresentada no capítulo 3, descrevendo as características macroscópicas e microscópicas da folha e pecíolo, e caracteres microscópicos do pó, revelou a importância morfológica da pilosidade da folha e tipologia dos tricomas, proeminência ao redor da base dos tricomas, aparência do bordo, e tipologia e características da nervação. Anatomicamente, as principais características são: epiderme de paredes espessas, estômatos anomocíticos e folha hipostomática, presença de hipoderme com paredes espessas e algumas vezes biestratificada, presença de células secretoras nos parênquimas, ocorrência de cristais, parênquima paliçádico biestratificado, parênquima esponjoso frouxo e com várias camadas, sistema vascular com bainha de fibras envolvendo o feixe, fibras

nos tecidos de condução e ocorrência de dois feixes menores junto à nervura principal.

As características dos tricomas foram divergentes da maioria das referências consultadas, já que não foi observada a presença de tricomas simples para esta espécie. Provavelmente, os autores observaram uma única célula de um tricoma parcial ou caduco, identificando esta como um tricoma simples. O pó atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, exceto os caracteres macroscópicos. As características microscópicas observadas concordam com as relatadas nas Farmacopéias Brasileira (FARMACOPÉIA, 1996), Britânica (BRITISH, 2000) e Portuguesa (FARMACOPOEA, 2002).

Outra característica muito importante para identificação da espécie é a consistência das folhas. Por tratar-se de uma espécie importada, a sua disponibilidade no mercado é apenas de folhas rasuradas e dessecadas, o que dificulta muito a análise botânica, já que é necessário um processo de hidratação e muitas vezes a integridade do material é afetada. Além disso, folhas rasuradas e dessecadas facilitam a adulteração do vegetal.

A análise botânica da espécie objetiva contribuir com o estabelecimento de parâmetros farmacopéicos, assim como a determinação de parâmetros de pureza, como a perda por dessecação, teor de materiais estranhos e cinzas totais. Estas análises estão descritas no capítulo 4, juntamente com a análise química quali e quantitativa.

A determinação química quali e quantitativa da boldina, alcalóide majoritário em *Peumus boldus*, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A técnica de CLAE vem se tornando o método de escolha para determinação química quali e, principalmente, quantitativa de plantas medicinais, pela possibilidade da análise de substâncias polares e não voláteis, compreendendo uma variedade de modos de separação e a identificação do constituinte desejado.

Vários fatores podem ser modificados na análise por CLAE para se obter a melhor separação, entre eles a coluna cromatográfica, o fluxo e composição da fase móvel e o tipo de detector. Neste trabalho a separação ocorreu de forma satisfatória com uma coluna em fase reversa com partículas de tamanho aproximado a 4 µm.

Além disso, um fluxo isocrático foi proposto, proporcionando maior tempo de utilização da fase móvel, já que a mesma pode ser recirculada no sistema. Toda a análise quali e quantitativa foi realizada com detector de arranjo de fotodiodos, pois a literatura já relatava a presença de um isômero da boldina (isoboldina), que apresentava os mesmos máximos de absorção e tempo de retenção muito próximo ao da boldina. Portanto fazia-se necessária a utilização de um detector que possibilitasse a identificação destes dois picos.

Após a determinação de um método para quantificação da boldina, o mesmo foi então validado. A validação é processo fundamental para a confiabilidade dos resultados e necessária para registro de qualquer medicamento, seja de origem vegetal ou biológica. Os parâmetros utilizados na validação do método seguiram as normas estabelecidas pelo ICH (1996), pela RDC n. 899 (BRASIL, 2003) e pela Farmacopéia Americana (USP, 2005). Estes órgãos regulamentam a validação de produtos farmacêuticos, porém não especificam os testes para produtos de origem vegetal. Desta forma, geralmente segue-se os parâmetros estabelecidos para matrizes complexas, que admitem maiores faixas de variações.

Com o método validado, as análises de estabilidade acelerada e de quantificação de boldina nas amostras comerciais de *Peumus boldus* puderam ser realizadas. Ambos seguiram os mesmos parâmetros utilizados na validação do método por CLAE.

O estudo de estabilidade acelerada é o primeiro passo para a determinação do prazo de validade de um produto farmacêutico, e deve estar sempre aliado a estudos de longa duração. Também neste caso, a CLAE continua sendo o método analítico de escolha, principalmente por permitir a identificação de compostos que possam vir a surgir ou desaparecer no decorrer do ensaio, assim, todos os picos do cromatograma podem ser monitorados.

Os resultados da análise de estabilidade demonstraram que houve uma redução percentual máxima no teor de boldina de 52,26%, alcançada em 60 dias da análise. Observou-se que todos os picos sofreram decaimentos nos valores de suas áreas com o aumento da permanência na câmara climática, sem o surgimento de novos componentes. Estes fatos já haviam sido relatados em outros estudos de

estabilidade acelerada de plantas (HEIGL & FRANZ, 2003; ARIGONY, 2005). Um dos motivos citados para este acontecimento é o de que poucas plantas resistam às condições preconizadas para os medicamentos nestes estudos.

Avaliando-se cineticamente os resultados, observou-se que a cinética de degradação para a espécie em estudo foi a de segunda ordem, onde a velocidade de reação é proporcional a concentração dos reativos ou a segunda potência de um deles (NUDELMAN, 1975). O tempo de meia vida da amostra ficou estimado em aproximadamente 165 dias. Cabe ressaltar que para este estudo partiu-se de uma amostra que já se encontrava dessecada, e este foi considerado o ponto zero desta amostra. Sabe-se que o processo de secagem e a data da coleta do material analisado, que não são conhecidos neste caso, interferem nos resultados, sendo que uma amostra fresca recém coletada apresentaria resultados mais confiáveis. Ainda, um número maior de amostras devem ser analisadas para maior confiabilidade dos resultados.

As grandes diferenças encontradas nos teores de boldina quantificadas em amostras comerciais da espécie, provenientes de países diferentes (Brasil, Chile e Argentina) reforça a necessidade de padronização destes produtos pela indústria de fitoterápicos.

Ainda escassos, os estudos tanto na área de controle de qualidade, como os de estabilidade e principalmente de quantificação de metais pesados em plantas medicinais, em um país com uma das maiores diversidades ecológicas do mundo, tornam-se de suma importância, contribuindo para o desenvolvimento da indústria de fitofármacos e visando a segurança com a utilização destes materiais.

**CONCLUSÕES**

---

## CONCLUSÕES

- ✓ As características morfológicas foliares de *Peumus boldus*, identificadas pela análise macroscópica, como: pilosidade, tipologia dos tricomas, proeminência ao redor da base dos tricomas, aparência do bordo, tipologia e características da nervação são muito relevantes e denotam valor taxonômico para a espécie;
- ✓ As observações realizadas na análise microscópica das folhas da espécie permitem indicar vários caracteres anatômicos como de valor taxonômico: epiderme de paredes espessas, estômatos anomocíticos e folha hipoestomática, presença de hipoderme com paredes espessas e algumas vezes biestratificada, presença de células secretoras nos parênquimas, ocorrência de cristais de oxalato de cálcio, parênquima paliçádico biestratificado, parênquima esponjoso frouxo e com várias camadas, sistema vascular com bainha de fibras envolvendo o feixe, fibras nos tecidos de condução e ocorrência de dois feixes menores junto à nervura principal;
- ✓ O teor médio encontrado de cinzas totais foi de 9,42%, respeitando os limites especificados nas Farmacopéias Brasileira, Britânica e Portuguesa;
- ✓ O teor de perda por dessecação pelo método gravimétrico foi de 10,44%, e com a termobalança com infravermelho foi de 9,87%;
- ✓ O conteúdo de materiais estranhos ultrapassou os limites indicados em todas as Farmacopéias consultadas;
- ✓ O método analítico desenvolvido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência mostrou-se satisfatório, sendo linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a quantificação de boldina em soluções extrativas de *Peumus boldus*, sendo, portanto, passível de utilização no controle de qualidade desta planta;
- ✓ Amostras de *Peumus boldus* adquiridas no comércio e indústrias do Brasil, Chile e Argentina tiveram teores de boldina diferenciados, inferindo que

fatores como época da coleta, transporte, armazenamento e outros influenciam no teor do marcador químico;

- ✓ O estudo preliminar de estabilidade acelerada demonstrou degradação da boldina de aproximadamente 52% em 60 dias de análise;
- ✓ Obteve-se uma reação de degradação com comportamento característico de segunda ordem, com velocidade de degradação igual a  $0,2236 \text{ dias}^{-1}$ ;
- ✓ O tempo de vida útil foi estimado em 18 dias e o tempo de meia-vida em 165 dias, sugerindo estudos com maior número de amostras e de longa duração para conclusões mais precisas;
- ✓ Todas as amostras analisadas tiveram teores de metais pesados abaixo do recomendado ou indicado pelas bibliografias disponíveis.





## REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A.A.K., KAWTHER, M.S., EL TANTAWY, M.E. BADEAA, R.I., KHAYRIA, N. Quantity stimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chemistry*. v. 67, p. 357-363, 1999.
- ABOY, A.L. *Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de Mikania glomerata Sprengel (guaco) (Asteraceae)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999. Dissertação (mestrado).
- ALONSO, J.R. *Tratado de Fitomedicina*. Buenos Aires: ISIS Ediciones S.R.L., 1998.
- ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytotherapy Research*. v. 14, p. 99-102, 2000.
- ARGÜESO, A.A. *Manual de Tecnicas en Histologia Vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1986.
- ARIGONY, A.L.V. *Determinação química e biológica de Bauhinia forficata Link subs. Pruinosa (pata-de-vaca, Leguminosae)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2005. Dissertação (mestrado).
- AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; GIVERNAU, M.; CASSELS, B.K.; VALENZUELA, A.; SPEISKY, H. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. *Agents Actions*. v. 42, p. 114-117, 1994.
- BARBOSA, M.C.S.; BELLETTI, K.M.; CORRÊA, T.F.; SANTOS, C.A. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) comercializadas em Curitiba, PR. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 11, n. 1, p. 1-4, 2001.
- BARCELOUX, G.D. Manganese, nickel. *Clinical Toxicology*. v. 37, p. 239-258 e 293-307, 1999.
- BARROSO, G. *Sistemática de Angiospermas no Brasil*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1978.
- BATISTIC, M.A.; AURICCHIO, M.T.; HOPPEN, V.R.; YAMASHITA, I.Y. Verificação da qualidade e identidade de chás medicinais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 49 n.1, p. 45-49, 1989.
- BERSIER, J.D. e BOCQUET, G. Les méthodes d'éclaircissement em vascularisation et em morphogénie végétales comparées. *Archival Science*. v. 13, n. 4, p. 555-566, 1960.
- BETTS, T.J. Chromatographic evaluation of boldine and associated alkaloids in Boldo. *Journal of Chromatography*. v. 511, p. 373-378, 1990.
- BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 199-208, 2001.
- BISSET, N.G.; WICHTL, M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Alemanha: CRC Press, 1994.

- BITTENCOURT, M.S. Cefixima: Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2003. Dissertação (mestrado).
- BORDAJANDI, L.R., GÓMEZ, G., ABAD, E., RIVERA, J., FERNÁNDEZ-BASTÓN, M., BLASCO, J., GONZÁLEZ, M.J. Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 992-1001, 2004.
- BRANDT, W.; GILG, E.; SCHÜRHOFF, P.N. *Farmacognosia. Materia Farmacéutica vegetal y animal*. 2 ed. Barcelona: Editorial Labor S.A., 1942.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. D.O.U. 29 agosto 1998.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 560, de 02 de abril de 2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. D.O.U. 03 abril 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. D.O.U. 02 junho 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. D.O.U. 18 março 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 1, de 29 de julho de 2005. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. D.O.U. 01 agosto 2005.
- BRITISH Pharmacopoeia*. Londres: BHMA, 2000.
- BRITISH Pharmacopoeia*. Londres: BHMA, 2004.
- BRITO FILHO, D. *Toxicologia Humana e Geral*. 2 ed. Rio de Janeiro/São Paulo: Atheneu, 1988.
- BRANDT, W.; GILG, E., SCHÜRHOFF, P.N. *Farmacognosia. Materia Farmacéutica vegetal y animal*. 2 ed. Barcelona: Editorial Labor S.A., 1942.
- BRUN, P. *Précis de Matière Médicale*. Paris: G. Doin e C<sup>ie</sup> Éditeurs, 1936.
- BRUNETON, J. *Farmacognosia*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2001.
- CALDAS, E.D., MACHADO, L.L. Cadmiun, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*. v. 42, p. 599-603, 1999.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 33, n. 1, p. 179-189, 2000.
- CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

- CEDERBAUM, A.I.; KUKIELKA, E.; SPEISKY, H. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. *Biochemical Pharmacology*. v. 44, p. 1765-1772, 1992.
- CHAMBERLAIN, C.J. *Methods in plant histology*. 5 ed. Chicago: The University of Chicago Press, 1932.
- CHUKHLOVIN, A.B., TOKALOV, S.V., YAGUNÓV, A.S., WESTENDORF, J., REINCKE, H., KARBE, L. *In vitro* suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Science Total Environmental*. v. 281, p. 153-163, 2001.
- COIMBRA, R.; SILVA, E.D. *Notas de Fitoterapia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958.
- COCCHI, M., FRANCHINI, G., MANZINI, D., MANFREDINI, M., MARCHETTI, A., ULRICI, A. A chemometric approach to the comparison of different sample treatments for metals determination by Atomic Absorption Spectroscopy in Aceto Balsâmico Tradizionale di Modena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 4047-4056, 2004.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. v. 60, p. 52-60, 1997.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. Kansas: Allen Press, 1988.
- CUNHA, A.P., SILVA, A.P., ROQUE, O.R. *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- DONDI, F.; KAHIE, Y.D.; LODI, G.; BLO, G.; PIETROGRANDE, C.; RESCHIGLIAN, P. Solvent selectivity effects in reversed-phase liquid chromatography of flavonoid compounds. *Journal of Chromatography*. v. 461, p. 281-292, 1989.
- DUARTE, R.P.S. e PASQUAL, A. Avaliação do Cádmiu (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. *Energia na Agricultura*. v. 15, n. 1, p. 46-58, 2000.
- DUKE, J.A. *The Green Pharmacy Herbal Handbook*. EUA: Rodale, 2000.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 755-767, 2001.
- ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Pharmacological Sciences*. v. 23, p. 136-139, 2002.
- ESCOPE Monographs*. Boldo folium, 1997.
- EUROPEAN Pharmacopoeia*. 4 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2002.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2003.
- FARMACOPEA Ufficiale della Republica Italiana. Roma: Instituto Poligrafico e Zecca dello Stato. P.V. 1991.
- FARMACOPÉIA Brasileira*. 4ed. 1988. São Paulo: Atheneu.
- FARMACOPÉIA Brasileira*. 4 ed. 1996. Fascículo I. São Paulo: Atheneu.

- FARMACOPÉIA Brasileira*. 4ed. 2000. Fascículo III. São Paulo: Atheneu.
- FARMACOPÉIA Portuguesa*. 7 ed. 1º vol. Lisboa : Ministério da Saúde, 2002.
- FOSTER, A. S. *Practical plant anatomy*. Princeton: van Nostrand. 1949.
- GARCIA, C.M. *Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica de Phyllanthus niruri e Phyllanthus tenellus Roxb*. Universidade Federal de Santa Maria, 2000. Dissertação (mestrado).
- GERLACH, D. *Botanische Microtechnik*. Stuttgart: Georg Thieme. 1984.
- GRIMM, W. Stability testing in industry. In: GRIMM, W. *Stability testing of drug products*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987. cap. 8, p. 157-169.
- GUPTA, M.P. *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. 1 ed. Santafé de Bogotá: Convenio Andres Bello, 1995.
- HAIDER, S.; NAITHANI, V., BARTHAWAL, J., KAKKAR, P. Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants. *Bulletin Environmental of Contaminants Toxicologics*. v. 72, p. 119-127, 2004.
- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade (UFRGS)/ Editora da UFSC, 2003.
- HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Die Pharmazie*. n. 12, p. 881-885, 2003.
- HÉRAIL, J. *Traité de matière médicale. Pharmacographie*. Paris: Libraire J. B. Baillière et Fils, 1927.
- HERBAL Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Mark Blumenthal, Alicia Goldberg, Josef Brinckmann (ed). Newton: IMC, 2000.
- HIDALGO, M.E.; GONZÁLEZ, I.; TORO, F.; FERNÁNDEZ, E.; SPEISKY, H.; JIMÉNEZ, I. Boldine as a sunscreen, its photoprotector capacity against UVB radiation. *Cosmetics Toiletries*. v. 113, p. 59-66, 1998.
- HOFFMANN, A. Seasonal growth rhythms in *Peumus boldus*, a dioecious tree of the Chilean Mediterranean vegetation. *Oecología Plantarum*. v. 2, n. 16, p. 31-39, 1981.
- HONG, D. D.; SHAH, M. Development and Validation of HPLC Stability-Indicating Assays. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. (Ed). *Drug Stability. Principles and Practices*. 3 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2000. v. 107.
- HSU, P.C., GUO, Y.L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. v.180, p. 33-44, 2002.
- HUGHES, D.W.; GENEST, K.; SKAKUM, W. Alkaloids of *Peumus boldus*. Isolation of Laurotetanina and Laurolitsina. *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 57, n. 9, p. 1619-1620, 1968a.
- HUGHES, D.W.; GENEST, K.; SKAKUM, W. Alkaloids of *Peumus boldus*. Isolation of (+) Reticuline and Isoboldine. *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 57, n. 6, p. 1023-1025, 1968b.

ICH. *International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B.* 1996. 8 p. Disponível na Internet no endereço <http://www.ich.org/>. Acesso em 15/03/2003.

JANG, Y.Y.; SONG, J.H.; SHIN, Y.K.; HAN, E.S.; LEE, C.S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*. v. 42, n. 4, p. 361-371, 2000.

JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. Nova Iorque: McGraw Hill, 1940.

KAKOSY, T., HUDAK, A., NARAY, M. Lead intoxication epidemic caused by ingestion of contaminated ground paprika. *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology*. v. 34, p. 507-511, 1996.

KANNAMKUMARATH, S.S., WUILLOUD, R.G., CARUSO, J.A. Studies of various elements of nutritional and toxicological interest associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 5773-5780, 2004.

KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B. *Toxicologia, a Ciência Básica dos Tóxicos, de Casarett e Doull*. Portugal: Editora McGraw-Hill, 2001.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A.I. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P450E1. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 18, n. 3, p. 559-563, 1995.

KUBÍNOVÁ, R.; MACHALA, M.; MINKSOVA, K. NECA, J.; SUCHY, V. Chemoprotective activity of boldine: modulation of drug-metabolizing enzymes. *Die Pharmazie*. v. 56, n. 3, p. 242-243, 2001.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulben Kian, 2001. v. 2, cap. 256.

LANHERS, M.C.; JOYEUX, M.; SOULIMANI, R.; FLEURENTIN, J.; SAYAG, M.; MORTIER, F.; YOUNUS, C.; PELT, J.M. Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Effects of a Traditional Medicinal Plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Medica*. v. 57, n.2, p. 110-115, 1991.

LAPA, A. J., FISCHMAN, L. A., SKOROPA, L. A., SOUCCAR, C. The water extract of *Coleus barbatus* Benth. decreases gastric secretion in rats. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 86, suplement. II, p. 141-143, 1991.

LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Ratón: CRC, 1989.

MAIGA, A., DIALLO, D., BYE, R., PAULSEN, B.S. Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, p. 2316-2321, 2005.

MARQUES, L.C.; BÓRIO, E.B.L. Levantamento das condições de produção fitoterápica em Curitiba. *Tribuna Farmacêutica*. v. 57/59, n. 1a 3, p. 87-94, 1991.

MARTÍN, J.S.; DOLI, U. *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae, Magnoliopsida) uma espécie silvestre promissora de Chile. *Studos Botânicos*. v. 17, p. 109-118, 1998.

MARTINEZ, L.A.; RÍOS, J.L.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Inhibition of nonenzyme lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids. *Free Radical Biological Medical*. v. 12, p. 287-292, 1992.

MATOS, F.J.A. A validação de novas drogas e plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 76, n. 4, p. 90-92, 1995.

MATOS, A.T.; FONTES, M.P.F.; JORDÃO, C.P.; COSTA, L.M. Mobilidade e formas de retenção de metais pesados em latossolo vermelho-amarelo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 20, p. 379-386, 1996.

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T. ; AMORIM, E.L.C. de; ANDRADE LIMA, C.S. ; ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 14, n. 2, p. 111-120, 2004.

MERCOSUL. Regulamento técnico do Mercosul, estabilidade de produtos farmacêuticos. Grupo Mercado Común. Resolución n. 53/96, 1996. Disponível na Internet no endereço <http://www.sice.oas.org>. Acesso em 23/11/2003.

METCALFE, C.R. e CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons*. 2 ed. Volume I. Oxford: Clarendon Press, 1979.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORENO, P.H.R.; VARGAS, V.M.; ANDRADE, H.H.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutation Research*. v. 260, p. 145-152, 1991.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Plantas Mediciniais. Guia para o Profissional da Saúde*. São Paulo: Editorial Premier, 2002.

NUDELMAN, N. S. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

O'BRIEN, T.P. e McCULLY, M.E. *The study of structure principles and selected methods*. Melbourne: Termarcaphi Pty., 1965.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*. v. 159, n. 1, p. 1-17, 2006.

OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

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

ORSI, D.; GAGLIARDI, L. MANNA, F.; TONELLI, D. HPLC Analysis of Boldine in Pharmaceuticals. *Chromatography*. v. 44, p. 619-622, 1997.

PALMIERI, R.M., LA PERA, L., DI BELLA, G., DUGO, G. Simultaneous determination of Cd (II), Cu (II), Pb (II) e Zn (II) by derivative stripping chronopotentiometry in *Pittosporum tobira* leaves: a measurement of local atmospheric pollution in Messina (Sicily, Italy). *Chemosphere*. v. 59, p. 1161-1168, 2005.

PARIS, R.R. e MOYSE, H. *Précis de Matière Médicale*. Tome II. Paris: Masson e C<sup>ie</sup> Éditeurs, 1967.

PAVEI, C. *Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de Ilex paraguariensis A. St. Hil.* Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2004. Dissertação (mestrado).

*PDR for herbal Medicines*. 1 ed. New Jersey: Medical Economics Company, 1999.

PIETTA, P.; MAURI, P. Determination of isoquinoline alkaloids from *Peumus boldus* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 457, p. 442-445, 1988.

PLANCHON, L.; BRETIN, P.; MANCEAU, P. *Précis de Matière Médicale*. Tome I. 5 ed. Paris: Libraire Maloine, 1946.

PEREIRA, C.E.; FELCMAN, J. Correlation between five minerals and the healing effect of Brazilian medicinal plants. *Biological Trace Element Research*. v. 65, n. 3, p. 251-259, 1998.

QUATTROCCHIO, O.A.; ANDRIZZ, S.A.; LABA, R.F. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Argentina: Farro S.A., p. 301-329, 1992.

RANCAN, R.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNÁNDEZ, E.; HIDALGO, M.E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANN, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemical and Photobiology B*. v. 68, p. 133-139, 2002.

REINIGER, I.W. Effect of *Peumus boldus* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with Technetium-99. *Applied Radiation And Isotopes*. v. 51, p. 145-149, 1999a.

REINIGER, I.W. Boldine action against the stannous chloride effect. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 68, p. 345-348, 1999b.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RÍOS, J.L.; CHOLBI, A.I.; HUGUET, A.; MORA, S.; MAÑEZ, M.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Effects of benzylisoquinolines on lipid peroxidation and superoxide scavenging. *Planta Medica*. v. 56, p. 645-656, 1990.

SANTANAM, N.; PENUMETCHA, M.; SPEISKY, H.; PARTHASARATHY, S. A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU 486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDLR  $-/-$  mice. *Atherosclerosis*. v. 173, p. 203-210, 2004.

SASS, J.E. *Elements of Botanical Microtechnique*. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1951.

SCHILCHER, H., PETERS, H., WANK, H. Pestizide und Schwermetalle in Arzneipflanzen und Arzneipflanzen-Zubereitungen. *Pharmazeutische Industrie*. v. 49, n. 2, p. 203-211, 1987 *apud* FARIAS, M.R. Avaliação da Qualidade de Matérias-Primas Vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade (UFRGS)/ Editora da UFSC, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, E.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODOLUZ, C.; ASTUDILLO, S.I.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radical Research*. v. 37, n. 4, p. 447-452, 2003.

- SCHULTZ, A. *Introdução à Botânica Sistemática*. 4 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, 1984. v. 2.
- SHARAPIN, N. *Fundamentos da Tecnologia de Fitoterápicos*. Bogotá: Cyted, 2000.
- SILVA, W. B. *Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a matéria-prima vegetal e solução extrativa de Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999. Dissertação (mestrado).
- SILVA, G. G. *Estudo da qualidade da informação constante nas bulas dos principais medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2005. Dissertação (mestrado).
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.P.; BASSANI, V.L. Farmacologia e toxicologia dos produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis : Ed. da UFRGS / Ed. da UFSC, 2003.
- SPEISKY, H.; CASSELS, B.K.; LISSI, E.A.; VIDELA, L.A. Antioxidants properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biochemical Pharmacology*. v. 41, n. 11, p. 1575-1581, 1991.
- SPEISKY, H., CASSELS, B.K. Boldo and boldine: an emerging case of Natural Drug Development. *Pharmacological Research*, v. 29, n. 1, p. 1-11, 1994.
- STEWART, M.J.; MOAR, J.J.; STEENKAMP, P.; KOKOT, M. Findings in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South African. *Forensic Science International*. v. 101, p. 177-183, 1999.
- STÉVIGNY, C.; WAUTIER, M.C.; JIWAN, J.L.H.; CHIAP, P.; HUBERT, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Quantitative Determination of Aporphine Alkaloids from Different Samples of *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*. v. 70, p. 764-760, 2004.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Method Validation. In: *Analytical Method Development and Validation*. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1997.
- TAKHTAJAN, A. *Diversity and classification of flowering plants*. Nova Iorque: Columbia University Press, 1996.
- TAVARES, T.M., CARVALHO, F.M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova*. v. 15, n. 2, p. 147-153, 1992.
- TAVARES, D.C.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell systems in vitro and in vivo. *Mutation Research*. v. 321, p. 139-145, 1994.
- THE COMPLETE German Commission E Monographs*. Texas: American Botanical Council, 1998.
- THE REVIEW of Natural Products*. 2 ed. St. Louis: Facts and Comparisons, 2002.
- TOLEDO, A C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*. v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.



UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzyloquinolines. *Free Radical Biological Medical*. v. 15, p. 159-167; 1993.

USP. The United States Pharmacopeia. NF 23. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VILA, R.; VALENZUELA, L.; BELLO, H. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Medica*. v. 65, n. 2, p. 178-179, 1999.

VILCHEZ, J.L. Determination of boldine in drug formulations by first-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. v. 12, n. 3, p. 313-317, 1994.

VOGEL, H.; RAZMILIC, I.; MUÑOZ, M.; DOLL, U.; MARTÍN, J.S. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). *Planta Medica*. v. 65, n. 1, p. 90-91, 1999.

ZUANAZZI, J.A. e MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, *et al* (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. 2 ed. Alemanha: Springer, 1996.

WASICKY, R. Chromatografic comparative study of essences of *Peumus boldus* extracted from commercial samples of the drug. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*. v. 1, p. 69-75, 1963.

WHO. *World Health Organization: Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products*. Geneva: WHO, 1993.

WHO. Stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. *World Helath Organization: Tecnical Report Series*. n. 863, anexo 5, 1996. Disponível no endereço <http://www.who.gov>. Acesso em 12/05/2003.

WHO - World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO, 1998.

YOUN, Y.C.; KNOW, O.S.; HAN, E.S.; SONG, J.H.; SHIN, Y.K.; LEE, C.S. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochemical Pharmacology*. v. 63, p. 495-505, 2002.

YOUNGKEN, H.W. *Textbook of pharmacognosy*. 5 ed. Filadélfia: The Blakiston Company, 1943.

YOUNGKEN, H.W. *Tratado de farmacognosia*. 6 ed. Cidade de México: Editorial Atlante, 1951.