

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE
INTERESSE PARA O SUS

BRASÍLIA, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE
INTERESSE PARA O SUS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo

BRASÍLIA, 2017

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE
INTERESSE PARA O SUS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Dâmaris Silveira (Presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr. Luiz Alberto Simeoni

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Maria de Fátima Borin

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Paula Melo Martins (suplente)

Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho às minhas queridas
avós, Aurivone e Terezinha, meus exemplos
de amor e fé.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de estar estudando.

À Professora Yris Maria Fonseca-Bazzo pela confiança para realização deste trabalho, pela orientação e paciência. Sou muito grata por todo o conhecimento adquirido durante esses dois anos.

À Professora Dâmaris Silveira por todo o conhecimento e, principalmente, pela orientação na reta final.

À Professora Pérola de Oliveira Magalhães e aos Professores Maurício Homem de Mello e Luiz Alberto Simeoni pelo apoio e disponibilidade para ajudar.

À Patrícia e Júlia pela paciência com minha desorganização, pela disponibilidade e por ajudar a manter o laboratório em ordem, possibilitando a execução de todos os trabalhos.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais e de Controle da qualidade de medicamentos, em especial aos amigos João, Manuel, Samuel, Paula, Larizza, Marcela, Gabi, Márcia, Patrícia, Yuri, Lorena e Diegue pelo apoio, disponibilidade em ajudar e por tornar o laboratório um ambiente tão agradável. Muito obrigada por cada momento inesquecível! Vocês estão guardados no meu coração!

Agradeço especialmente ao amigo Diegue, pelo companheirismo, paciência e por todos os ensinamentos.

A todos os meus amigos e minha família que me incentivaram, torceram e rezaram por mim.

À CAPES, FAP/DF e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu amigo e namorado João Rafael, meu maior incentivador, pela paciência, por me acolher nos momentos de desânimo e por nunca me deixar desistir.

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu
Mas nele é que espelhou o céu.*

Fernando Pessoa

RESUMO

A fitoterapia vem ganhando destaque no cenário da saúde pública no Brasil. Atualmente, doze espécies vegetais fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), sendo ofertados gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Contudo, o monitoramento da qualidade destes medicamentos é fundamental para a promoção do acesso seguro e proteção da saúde individual e coletiva. Assim, foram selecionadas quatro espécies (*Cynara scolymus*, *Rhamnus purshiana*, *Mikania glomerata* e *Uncaria tomentosa*), das doze elencadas na RENAME, com o objetivo de avaliar a qualidade de fitoterápicos disponíveis no comércio. Os parâmetros avaliados foram: informações nos rótulos e bulas, características organolépticas, peso médio, pH, densidade, volume médio, friabilidade, desintegração, compostos majoritários e marcadores fitoquímicos. Foram utilizados os métodos gerais de avaliação da qualidade presente na Farmacopeia Brasileira – 5ª edição e os métodos específicos para cada espécie vegetal de acordo com monografias presentes em outras farmacopeias oficiais. Desvios significativos na qualidade foram observados na análise de bula e na análise do teor dos marcadores fitoquímicos. Foi realizada uma revalidação de um método farmacopeico para possibilitar a análise por CLAE-DAD da maioria dos derivados cafeoilquínicos nas amostras de *C. scolymus*, nas quais foi observado a não-conformidade do conteúdo destes marcadores com o recomendado pela Anvisa. As amostras de *M. glomerata* foram avaliadas quanto à presença de cumarina e todas apresentaram uma quantidade de cumarina compatível com a dose diária recomendada. Houve dificuldade na reprodução do método espectrofotométrico para avaliação da presença do cascarosídeo nas amostras de *R. purshiana*. Então, foi utilizado um método por CLAE-DAD e as amostras foram comparadas com o casantranol. As amostras de *U. tomentosa* foram avaliadas quanto à presença de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) e tetracíclicos (AOT). Apesar de apresentarem quantidade adequada de AOP, a relação AOT/AOP foi inadequada. Em conclusão, foi possível observar desvios na qualidade de todos os fitoterápicos em pelo menos um teste, o que pode representar um potencial risco para a saúde.

Palavras-chave: Controle da qualidade; fitoterápicos; *Cynara scolymus*; *Rhamnus purshiana*; *Mikania glomerata*; *Uncaria tomentosa*

ABSTRACT

The Phytomedicine has been gaining prominence in the Brazilian public health scenario. Currently, twelve plant species are part of the National List of Essential Medicines (RENAME), and are offered free by the public health system. However, the quality monitoring of these drugs is critical to the promotion of safe access and protection of individual and collective health. Thus, four species (*Cynara scolymus*, *Rhamnus purshiana*, *Mikania glomerata* and *Uncaria tomentosa*) were selected from the twelve listed in RENAME, with the objective of evaluating the quality of the herbal medicines available in the market. The following parameters were analyzed: Information on the labels and package leaflets, organoleptic characteristics, weight, pH, density, mean volume, friability, disintegration, major compounds and phytochemical markers. The general methods of evaluation present in the Brazilian Pharmacopoeia – 5th edition and the specific methods for each plant species according to the monographs present in other official pharmacopoeias were used. Significant deviations in quality were observed in the package leaflets and in the analysis of the phytochemical markers content. A revalidation of a pharmacopoeial method was performed to allow the analysis of the caffeoylquinic derivatives in *C. scolymus* samples by HPLC-DAD, in which the content of these markers was observed to be non-conforming with the recommended by Anvisa. *M. glomerata* samples were evaluated regarding the presence of coumarin and all showed a coumarin content compatible with the recommended daily intake. There were difficulties in the reproduction of the spectrophotometric method to evaluate the presence of cascarosides in samples of *R. purshiana*. Then, a method by HPLC-DAD was used and the samples were compared with casanthranol. Finally, *U. tomentosa* samples were evaluated regarding the presence of pentacyclic (POA) and tetracyclic (TOA) oxindole alkaloids. Although they presented an adequate amount of POA, the TOA/POA ratio was inadequate. In conclusion, it was possible to observe deviations in the quality of all herbal medicines in at least one test, which may represent a potential risk to the health.

Keywords: Quality control; Herbal medicines; *Cynara scolymus*; *Rhamnus purshiana*; *Mikania glomerata*; *Uncaria tomentosa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos derivados cafeoilquínicos encontrados nas folhas de <i>Cynara scolymus</i>	23
Figura 2 - Estrutura química do principal flavonoide encontrado nas folhas de <i>Cynara scolymus</i> , luteolina-7-glucosídeo.	24
Figura 3 - Principais compostos da espécie <i>Rhamnus purshiana</i>	26
Figura 4 - Estrutura química da cumarina	28
Figura 5 - Principais alcaloides encontrados da espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	29
Figura 6 - Amostras das marcas A, B e C dos fitoterápicos de <i>Cynara scolymus</i> ...	58
Figura 7 - Amostras dos lotes A, B e C do fitoterápico de <i>Rhamnus purshiana</i>	59
Figura 8 - Amostras das marcas A, B e C dos fitoterápicos de <i>Mikania glomerata</i> ...	59
Figura 9 - Amostras das marcas A e B dos fitoterápicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	60
Figura 10 - Peso dos comprimidos e cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de <i>Cynara scolymus</i>	62
Figura 11 - Peso do conteúdo das cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de <i>Rhamnus purshiana</i>	63
Figura 12 - Peso dos comprimidos e cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	64
Figura 13 - Curvas de regressão linear dos marcadores de <i>Cynara scolymus</i>	70
Figura 14 - Análise da seletividade do método para determinação de derivados cafeoilquínicos nos fitoterápicos de <i>Cynara scolymus</i>	73
Figura 15 - Perfil cromatográfico e espectros da marca A de <i>Cynara scolymus</i>	77
Figura 16 - Perfil cromatográfico e espectros da marca B de <i>Cynara scolymus</i>	78
Figura 17 - Perfil cromatográfico e espectros da marca C de <i>Cynara scolymus</i>	79
Figura 18 - Perfil cromatográfico das amostras de <i>Cynara scolymus</i> por cromatografia em camada delgada.....	84
Figura 19 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote A de <i>Rhamnus purshiana</i> obtidos por CLAE-DAD.....	87
Figura 20 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote B de <i>Rhamnus purshiana</i> obtidos por CLAE-DAD.....	87
Figura 21 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote C de <i>Rhamnus purshiana</i> obtidos por CLAE-DAD.....	88

Figura 22 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV da substância de referência, casantranol, obtidos por CLAE-DAD.	88
Figura 23 - Perfil cromatográfico por CCD das amostras de <i>Rhamnus purshiana</i>	90
Figura 24 - Perfis cromatográficos e espectros das amostras de <i>Mikania glomerata</i>	92
Figura 25 - Perfil cromatográfico do padrão de cumarina e seu espectro obtido por CLAE-DAD.	93
Figura 26 - Perfil cromatográfico do extrato padronizado de <i>Uncaria tomentosa</i> obtido por CLAE-DAD.	95
Figura 27 - Perfil cromatográfico do fitoterápico da marca A de <i>Uncaria tomentosa</i> obtido por CLAE-DAD..	96
Figura 28 - Perfil cromatográfico do fitoterápico de <i>Uncaria tomentosa</i> da marca B obtido por CLAE-DAD..	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de avaliação da determinação do peso de comprimidos, de acordo com a Farmacopeia Brasileira – 5ª edição.	33
Tabela 2 - Critérios de avaliação da determinação do peso de cápsulas, de acordo com a Farmacopeia Brasileira – 5ª edição.	34
Tabela 3 - Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de <i>Cynara scolymus</i>	38
Tabela 4 - Concentrações dos padrões e da amostra utilizadas para a obtenção da concentração teórica final na análise de exatidão.	41
Tabela 5 - Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de <i>U. tomentosa</i>	46
Tabela 6 - Medicamentos fitoterápicos obtidos e suas especificações	49
Tabela 7 - Vigência dos registros de acordo com portal da Anvisa	51
Tabela 8 - Análise de embalagens primárias de acordo com a RDC 71/2009	52
Tabela 9 - Análise de embalagens secundárias de acordo com a RDC 71/2009.	53
Tabela 10 - Análise de bulas de acordo com a RDC 47/2009 e bulas padrão.	55
Tabela 11 - Peso médio avaliado conforme os critérios estabelecidos na Farmacopeia Brasileira – 5ª edição.	61
Tabela 12 - Volume, densidade e pH das amostras de <i>Mikania glomerata</i>	65
Tabela 13 - Viscosidade das amostras de <i>Mikania glomerata</i>	66
Tabela 14 - Tempo de desintegração dos comprimidos e cápsulas.	67
Tabela 15 - Linearidade dos marcadores do fitoterápico de <i>Cynara scolymus</i>	69
Tabela 16 - Limites de quantificação e detecção dos marcadores de <i>Cynara scolymus</i>	71
Tabela 17 - Precisão do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos em fitoterápicos de <i>Cynara scolymus</i>	72
Tabela 18 - Amostra sem indução de hidrólise na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.	74
Tabela 19 – Amostra com indução de hidrólise ácida na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.	74
Tabela 20 – Amostra com indução de hidrólise básica na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.	75

Tabela 21 - Análise da exatidão do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.....	76
Tabela 22 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca A de <i>Cynara scolymus</i>	80
Tabela 23 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca B de <i>Cynara scolymus</i>	80
Tabela 24 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca C de <i>Cynara scolymus</i>	80
Tabela 25 - Tempo de retenção e área dos padrões de <i>Cynara scolymus</i> a 25 µg/mL	81
Tabela 26 - Teor dos marcadores de <i>Cynara scolymus</i> determinado por CLAE-DAD	81
Tabela 27 - Teor dos marcadores de <i>Cynara scolymus</i> expressos em ácido clorogênico determinado por CLAE-DAD	82
Tabela 28 - Absorbâncias obtidas no teste de quantificação de cascarosídeos por espectrofotometria.....	86
Tabela 29 - Áreas dos picos majoritários das amostras de <i>Rhamnus purshiana</i>	89
Tabela 30 - Tempo de retenção, área e similaridade dos picos referentes a cumarina nas amostras de <i>Mikania glomerata</i>	93
Tabela 31 - Teor de cumarina declarado no rótulo e determinado.....	94
Tabela 32 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca A de <i>Uncaria tomentosa</i>	98
Tabela 33 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca B de <i>Uncaria tomentosa</i>	98
Tabela 34 - Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOP – Alcaloides oxindólicos pentacíclicos

AOT – Alcaloides oxindólicos tetracíclicos

CBPF – Certificado de Boas Práticas de Fabricação

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Comp – Comprimido

CP – Consulta pública

CV – Coeficiente de variação

DF – Distrito Federal

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

EP – Farmacopeia Europeia

EPR – Erro Padrão Relativo

FB – Farmacopeia Brasileira

IC – Inclinação da reta

IN – Instrução Normativa

LCQ – Laboratório de controle da qualidade de medicamentos

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNPIC – Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PTF – Produto Tradicional Fitoterápico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução específica

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

Rf – Fator de retenção

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

UnB – Universidade de Brasília

USP – United States Pharmacopeia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 BREVE HISTÓRICO DA REGULAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL	18
2.2 CONTROLE DA QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS	20
2.3 FITOTERÁPICOS	22
2.3.1 <i>Cynara scolymus</i> L	22
2.3.2 <i>Rhamnus purshiana</i> DC	24
2.3.3 <i>Mikania glomerata</i> Spreng	26
2.3.4 <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MÉTODOS	32
4.1 OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	32
4.2 VERIFICAÇÃO DO REGISTRO	32
4.3 ANÁLISE DE RÓTULOS E BULAS.....	32
4.4 MÉTODOS GERAIS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE	33
4.4.1 Caracterização organoléptica	33
4.4.2 Determinação do peso médio	33
4.4.3 Determinação da resistência mecânica de comprimidos	34
4.4.4 Determinação da densidade e volume	35
4.4.5 Determinação do pH	36
4.4.6 Determinação da viscosidade	36
4.4.7 Teste de desintegração	36
4.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS POR CLAE-DAD	37
4.5.1 <i>Cynara scolymus</i>	37

4.5.2 <i>Rhamnus purshiana</i>	42
4.5.3 <i>Mikania glomerata</i>	44
4.5.4 <i>Uncaria tomentosa</i>	45
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	47
4.6.1 <i>Cynara scolymus</i>	47
4.6.2 <i>Rhamnus purshiana</i>	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	49
5.2 VERIFICAÇÃO DO REGISTRO	50
5.3 ANÁLISE DE RÓTULOS E BULAS.....	52
5.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE	57
5.4.1 Caracterização organoléptica	57
5.4.2 Determinação do peso médio	60
5.4.3 Determinação da resistência mecânica de comprimidos	64
5.4.4 Determinação da densidade, volume e pH	65
5.4.5 Determinação da viscosidade	66
5.4.6 Determinação do tempo de desintegração	66
5.5 MÉTODOS ESPECÍFICOS	67
5.5.1 <i>Cynara scolymus</i>	67
5.5.2 <i>Rhamnus purshiana</i>	85
5.5.3 <i>Mikania glomerata</i>	91
5.5.4 <i>Uncaria tomentosa</i>	95
6 CONCLUSÃO	101
7 PERSPECTIVAS	103

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é reconhecidamente um dos primórdios da história da medicina. Apesar da modernização e do surgimento dos medicamentos sintéticos, essa prática ainda possui um papel fundamental na atenção primária de saúde. Neste sentido, desde a Conferência em Alma-Ata, em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS), vem recomendando a incorporação da fitoterapia no âmbito da saúde pública (1,2).

Além das recomendações da OMS, a partir da década de 1980, houve a intensificação do interesse popular e institucional em relação à inclusão da fitoterapia no sistema brasileiro de saúde pública. Houve a implantação, em âmbito nacional, de programas de pesquisa com a finalidade de obter embasamento científico para a inclusão de preparações a base de plantas medicinais na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Foram feitas, ainda, recomendações nas conferências nacionais de saúde para a introdução de práticas alternativas de assistência à saúde, incluindo a fitoterapia (3,4).

Considerando tais recomendações e tendo em vista a necessidade de ampliar as opções terapêuticas na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, o Ministério da Saúde criou, em 2006, duas políticas: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF) (3,5).

Apenas um ano após a implementação dessas políticas, em 2007, foram inseridos dois fitoterápicos na RENAME (6). Em 2009 foram inseridos mais seis fitoterápicos (7) e, atualmente, doze fitoterápicos constam na RENAME 2014, sendo oferecidos gratuitamente pelo SUS (8).

Desde então a fitoterapia vem crescendo no Brasil e, de acordo com o Ministério da Saúde, é estimado que entre 2013 e 2015 houve o crescimento de 161% da busca por tratamentos a base de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, beneficiando cerca de 12 mil pessoas (9). Contudo, o aumento da utilização desses produtos requer uma maior preocupação. A PNPMF reforça, por meio de suas diretrizes, que o acesso a plantas medicinais e fitoterápicos deve ser com segurança,

eficácia e qualidade, e traz como uma das ações necessárias, o monitoramento da qualidade (3).

Nesta perspectiva quatro fitoterápicos, dos doze inseridos na RENAME e ofertados gratuitamente pelo SUS, foram avaliados quanto à qualidade. Os achados fornecem subsídios para redução de riscos associados aos desvios da qualidade, beneficiando os usuários do sistema de saúde e minimizando gastos públicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BREVE HISTÓRICO DA REGULAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL

Em 1931 a legislação Brasileira já reconhecia o uso terapêutico de plantas medicinais através do Decreto nº 19.606/1931, que incluiu, como atribuição privativa do profissional farmacêutico, as plantas medicinais de uso terapêutico (10). Porém, apenas em 1967 houve a publicação de uma legislação específica para a regulamentação de fitoterápicos, a Portaria nº 22/1967, que estabelecia normas para o emprego de preparações fitoterápicas (11).

Na década de 70, devido à crescente preocupação em relação à qualidade dos medicamentos comercializados no Brasil, houve a publicação das leis nº 5.991/1973 e nº 6.360/1976, ainda vigentes, que abordam aspectos sobre o controle sanitário de medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos (12,13).

A Lei 5.991/1973 estabelece a coleta periódica de amostras dos produtos para análise fiscal e destaca que apenas medicamentos que obedecem aos padrões de qualidade oficialmente reconhecidos podem ser dispensados. Além disso, especificamente para o comércio de plantas medicinais em farmácias e ervanarias, devem ser observados o acondicionamento adequado e a classificação botânica, fatores que podem interferir diretamente na qualidade e eficácia (12).

Apesar de não apresentar qualquer especificação acerca de plantas medicinais ou fitoterápicos, a Lei 6.360/1976 foi um marco no contexto da vigilância sanitária. Esta lei apresentou o conceito de controle da qualidade como “conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por esta Lei, que satisfaçam as normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade” (13).

Durante a década de 1980, as pesquisas com plantas medicinais ganharam um maior destaque no cenário brasileiro, principalmente quando foi instituído, em 1982, o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (PPPM/Ceme) onde foram selecionadas, com base no uso popular, 74 espécies vegetais para estudo (14).

Juntamente com o avanço das pesquisas com as plantas medicinais e o início da introdução da fitoterapia nos serviços de saúde, a necessidade de controlar e assegurar a qualidade dos fitoterápicos tornou-se cada vez mais evidente. Durante a Assembleia Mundial da Saúde, realizada em 1987, foi recomendado aos Estados-membros iniciar programas amplos para assegurar a qualidade dos produtos tradicionais extraídos de plantas (3).

E em 1995, foi publicada a Portaria nº 06, de 31 de janeiro de 1995, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), que instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Além disso, houve a introdução de um termo importante no contexto do controle da qualidade de fitoterápicos, o termo “marcadores”, que de acordo com esta portaria, são os constituintes químicos presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente os próprios ativos, destinados ao controle da qualidade (15).

No ano 2000, houve a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2000, pela Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa), que atualizou a regulamentação do registro de fitoterápicos. Nesta norma, a denominação “produto fitoterápico” foi substituída por “medicamento fitoterápico”, propiciando uma mesma atenção às exigências requeridas para qualquer outro medicamento. Também houve a introdução da definição de medicamento fitoterápico tradicional, que tem seu uso alicerçado na tradição popular (16).

Posteriormente, a RDC 17/2000 deu lugar à RDC 48/2004, que foi acompanhada de diversas resoluções específicas para a normatização do registro dos medicamentos fitoterápicos e introduziu, como requisito para obtenção do registro, a apresentação do Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF) (17). Após seis anos, em 2010, a normatização foi novamente atualizada a partir da publicação da RDC 14/2010, que apresentou alternativas para o controle da qualidade em cada etapa da produção (18).

Por fim, a norma vigente para o registro de fitoterápicos é a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que apresentou importantes inovações em relação às normativas anteriores. Com o intuito de proporcionar maior clareza à população acerca do modo de comprovação de segurança e eficácia (testes clínicos ou uso tradicional) dos

fitoterápicos, a RDC 26/2014 separou estes nas categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico (19).

As duas categorias incluem os produtos obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, não considerando aqueles que incluam em sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas e nem as associações dessas com outros extratos (20).

A diferença entre as duas categorias consiste, principalmente, no embasamento da segurança e eficácia. Os medicamentos fitoterápicos possuem sua segurança e eficácia baseada em evidências clínicas e são caracterizados pela constância de sua qualidade. Os produtos tradicionais fitoterápicos (PTF) baseiam-se no uso seguro e efetivo publicado na literatura técnico-científica e são concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para diagnóstico, prescrição ou monitorização. Além disso, os PTF não podem se referir a problemas graves de saúde, não podem conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica (20).

2.2 CONTROLE DA QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

Os fitoterápicos são obtidos a partir de matérias-primas vegetais constituídas por um fitocomplexo, ou seja, diversas substâncias originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis pelos efeitos biológicos (20). Tais substâncias estão sujeitas a uma grande variabilidade causada por diversos fatores como a variação climática (21–23), condições de cultivo (24,25), armazenamento e processo extrativo (26–28).

Além da variabilidade dos seus compostos, os extratos vegetais podem ser contaminados com metais-pesados, agrotóxicos e microrganismos (29–31); e podem sofrer adulterações com fármacos convencionais ou outras espécies vegetais (32–34). Todos esses fatores podem contribuir para a alteração da qualidade, segurança e eficácia dos fitoterápicos e, por isso, o controle da qualidade rigoroso durante todo o processo de fabricação é essencial (35,36).

A RDC 26/2014 apresenta os requisitos necessários para o registro dos medicamentos fitoterápicos e registro ou notificação dos PTF. Além de uma série de documentos relativos a taxas e autorização sanitária, a resolução exige Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF), relatório de produção, controle da qualidade, estabilidade, segurança e eficácia (20).

O CBPF deve obedecer às exigências da RDC 17/2010 para a produção dos medicamentos fitoterápicos e a RDC 13/2013 para a produção de PTF (20). A exigência de tal requisito possibilita a minimização dos riscos associados ao processo produtivo e é essencial para assegurar a manutenção dos padrões de qualidade dos medicamentos (37).

Outro importante requisito é a entrega do layout dos rótulos e das bulas ou folhetos informativos. Para os medicamentos fitoterápicos, os rótulos devem estar de acordo com a RDC 71/2009 e as bulas conforme a RDC 47/2009. No lugar da bula, os PTF devem apresentar o folheto informativo que deve seguir o disposto na RDC 26/2014 (19).

O relatório de controle da qualidade deve contemplar desde as matérias primas até o produto acabado. As metodologias devem seguir, preferencialmente, os métodos gerais e monografias específicas presentes na Farmacopeia Brasileira ou farmacopeias estrangeiras admitidas pela Anvisa na RDC 37/2009. Quando a utilização de referências farmacopeicas não for possível, o método analítico deve ter embasamento técnico-científico e ser validado de acordo com o Guia de validação vigente, a resolução específica (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003 (20).

Entre as exigências do relatório de controle da qualidade, ressalta-se a necessidade da identificação química da droga vegetal, derivado vegetal e produto acabado, que pode ser realizada por meio da obtenção do perfil cromatográfico por técnicas como a cromatografia de camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (19).

As técnicas cromatográficas permitem a separação dos compostos químicos e visualização do perfil químico do material vegetal, permitindo a diferenciação entre as espécies (38,39). Além disso, estas técnicas representam um dos poucos métodos

capazes de identificar materiais altamente processados, no qual não é possível a identificação macroscópica e microscópica da planta (40).

A CLAE também possibilita a quantificação dos marcadores químicos, que são substâncias ou classes de substâncias que servem como referência para o controle da qualidade do material vegetal. Os marcadores são considerados ativos quando possuem relação com o efeito terapêutico, e analíticos quando ainda não foi estabelecida esta relação. Preferencialmente, devem ser escolhidos marcadores ativos (19,41).

2.3 FITOTERÁPICOS

2.3.1 *Cynara scolymus* L.

A espécie vegetal *Cynara scolymus* L., pertencente à família Asteraceae, também é conhecida pelas suas sinônimas *Cynara cardunculus* L. e *Cynara cardunculus* subsp *cardunculus*, e pelo nome popular alcachofra (42). A planta é nativa do sul da Europa, no mediterrâneo, e do norte da África. Atualmente, é amplamente cultivada pelo mundo para sua utilização como comida ou planta medicinal (43).

A espécie é uma planta herbácea que se desenvolve até 1,5 a 2 metros de altura. As folhas, comumente utilizadas para a produção de fitoterápicos, possuem margens dentadas, são pilosas, verdes-acinzentadas, arqueadas e lobuladas. A parte comestível consiste em um broto, conhecido como “coração” da planta, envolvido por brácteas (43,44).

Tradicionalmente, as folhas são utilizadas para perda de peso (45,46), tratamento de diabetes (47,48), de disfunções renais (48,49), de hipercolesterolemia (48,49), de disfunções hepáticas e biliares (48–52) e de problemas no sistema digestório em geral (52,53). Estudos clínicos e não clínicos evidenciam, principalmente, sua eficácia em relação à diminuição do colesterol e tratamento de dispepsia (54–58).

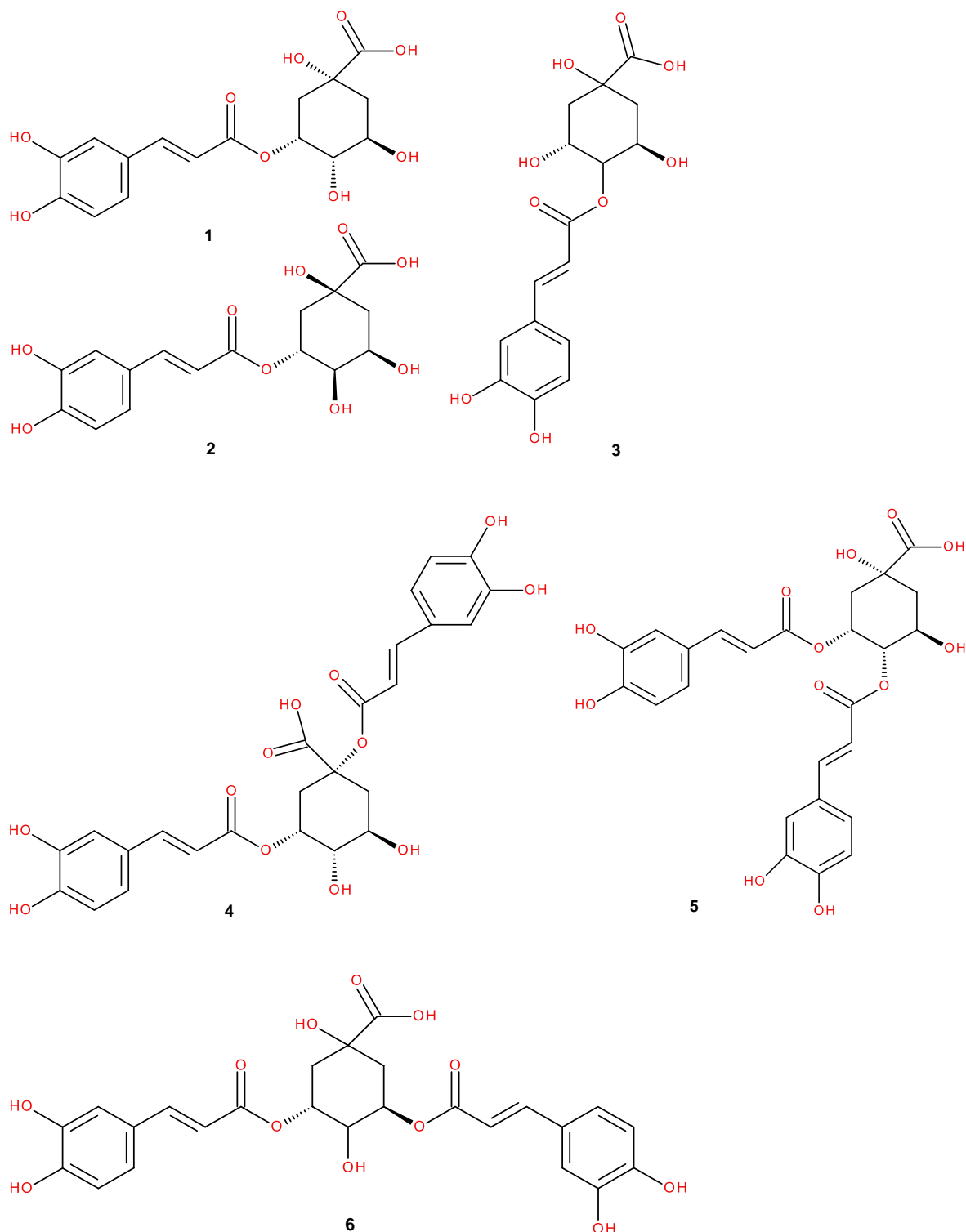


Figura 1 – Estruturas químicas dos derivados cafeoilquínicos encontrados nas folhas de *Cynara scolymus*. 1: ácido neoclorogênico; 2: ácido clorogênico; 3: ácido criptoclorogênico; 4: cinarina; ; 5: ácido isoclorogênico C; 6: ácido isoclorogênico A.

Na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), a alcachofra consta com as indicações de uso para o tratamento dos sintomas de dispepsia

funcional (desconforto pós-prandial) e de hipercolesterolemia leve a moderada, apresentando ação colagoga (estimulante do fluxo da bile do ducto biliar para o duodeno) e colerética (estimulante da produção de bile pelo fígado) (8).

As folhas da espécie *C. scolymus* são constituídas, principalmente, por ácidos cafeoilquínicos (ácidos clorogênico, criptoclorogênico, neoclorogênico, isoclorogênico A, B e C e cinarina) (Figura 1) e flavonoides (derivados da luteolina, da apigenina e da narigenina), sendo o ácido clorogênico (2) o composto majoritário (59,60). Além do ácido clorogênico, a cinarina (4) e a luteolina-7-glucosídeo (7) são relatados como principais componentes responsáveis pela atividade farmacológica da planta (61–63).

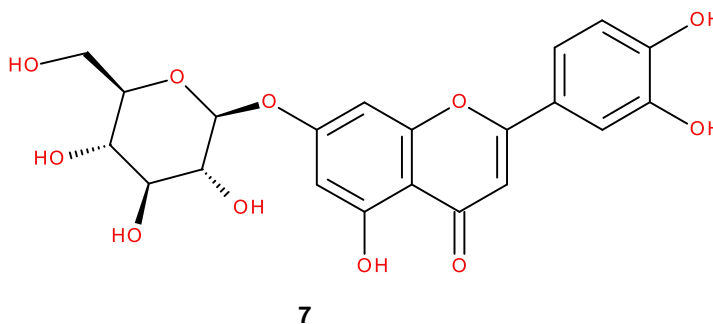


Figura 2 - Estrutura química do principal flavonoide encontrado nas folhas de *Cynara scolymus*, luteolina-7-glucosídeo (7).

Em relação ao controle da qualidade da planta, a Farmacopeia Brasileira - 3ª edição (1977) apresentou um método espectrofotométrico para a quantificação de cinarina. Atualmente, a Anvisa indica a utilização do método por CLAE-DAD da Farmacopeia Europeia para doseamento de ácido clorogênico, porém, recomenda a inclusão de outros derivados cafeoilquínicos na análise (64). A espécie também está descrita nas Farmacopeias Francesa, Britânica, Romena, Italiana e Africana (65).

2.3.2 *Rhamnus purshiana* DC

Rhamnus purshiana DC ou *Frangula purshiana* (DC.) A. Gray é uma espécie vegetal da família Rhamnaceae (66), nativa do sudeste do Canadá e noroeste do

pacífico dos Estados Unidos da América. No Brasil, é comumente conhecida como Cáscara-sagrada e utilizada na medicina tradicional como laxativo. Também está inserida no elenco de fitoterápicos da RENAME 2014, com indicação de uso como coadjuvante nos casos de obstipação intestinal eventual (8).

A espécie consiste em um arbusto ou árvore de porte pequeno de altura entre 4,5 a 10 metros, contendo folhas elípticas e acuminadas e frutos pequenos preto-arroxeados. As partes utilizadas para obtenção dos fitoterápicos, cascas do caule e dos ramos, são fragmentos achatados ou transversalmente curvos com superfície externa marrom-avermelhada, ocasionalmente coberta de musgo ou líquen. A superfície interna é castanho-amarelado com estrias longitudinais (44).

O mecanismo da ação laxativa da espécie é bem estabelecido na literatura científica, ocorrendo pela ação de compostos antracênicos. Os glicosídeos hidroxiantracênicos são hidrolisados no cólon por bactérias intestinais e os metabólitos gerados agem como estimulantes e irritantes. Há um aumento da motilidade do intestino e aumento da permeabilidade paracelular. Assim, o trânsito do bolo fecal é acelerado e há um acúmulo de líquido na luz intestinal (67–69).

Os derivados hidroxiantracênicos existem em diversos estados de oxidação. Nas cascas frescas há a predominância de antronas livres, compostos que podem causar ações mais potentes incluindo vômitos e cólicas abdominais. Enquanto nas cascas frescas prevalecem as antraquinonas, compostos mais oxidados com efeitos mais brandos em relação às antronas (67,70,71). Dessa forma, as farmacopeias recomendam a utilização da droga vegetal após um ano da coleta ou após processo de oxidação acelerado por meio de secagem em estufa (44,72,73).

Os cascarosídeos (Figura 3) são os principais compostos hidroxiantracênicos encontrados na cáscara-sagrada, portanto são utilizados como marcador da espécie. A quantificação destes compostos nos derivados vegetais de *R. purshiana*, é realizada por métodos espectrofotométricos descritos nos compêndios oficiais. Há monografia de controle da qualidade da espécie na Farmacopeia Brasileira – IV edição, Farmacopeia Europeia – 7ª edição, Farmacopeia dos Estados Unidos – USP 30 NF. Os métodos seguem o mesmo princípio, diferenciando-se, principalmente, pelos solventes utilizados (44,72,73).

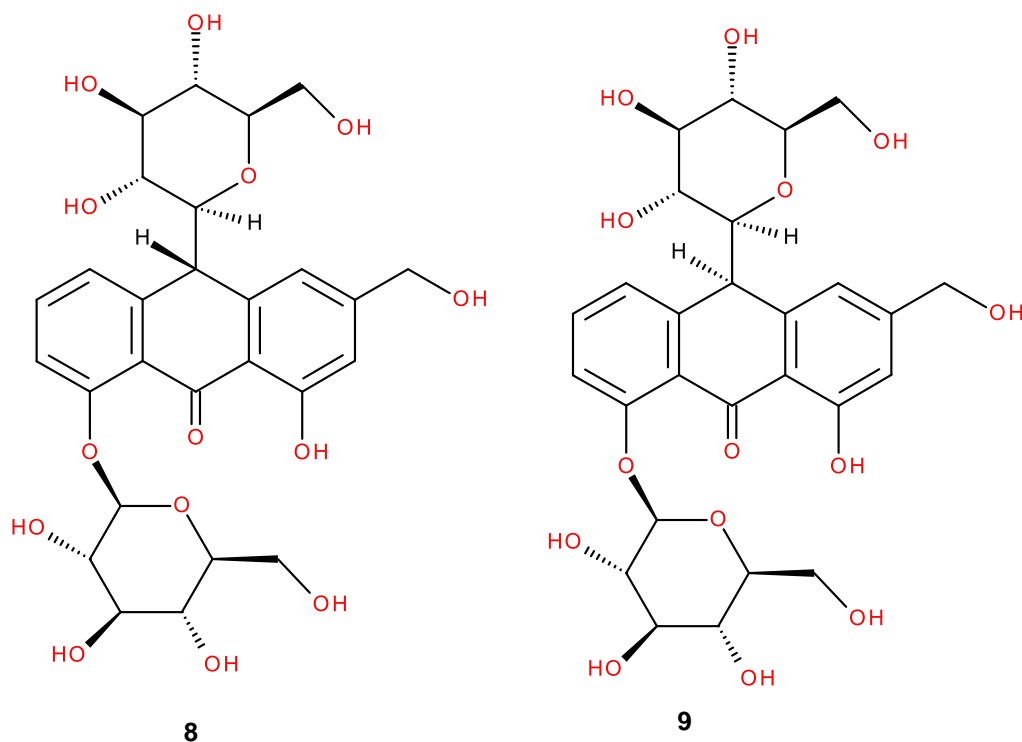


Figura 3 - Principais compostos da espécie *Rhamnus purshiana*. A: cascarosídeo A (**8**); B: cascarosídeo B (**9**)

2.3.3 *Mikania glomerata* Spreng

A espécie *Mikania glomerata* Spreng, conhecida popularmente como guaco, é uma planta Brasileira de grande importância que esteve no elenco de plantas da primeira edição da Farmacopeia Brasileira, em 1929 (74), e foi um dos primeiros fitoterápicos a serem inseridos na lista de referência da assistência farmacêutica básica, no ano de 2007 (6). Além disso, em pesquisa realizada em 2012, foi verificado que o guaco era a espécie vegetal Brasileira com maior número de registros na Anvisa (75).

Esta espécie pertence à família Asteraceae e é encontrada principalmente na Mata Atlântica, nas regiões Sul e Sudeste. Apresenta-se na forma de trepadeira sublenhosa e habita florestas ciliares, ombrófilas e ombrófilas mistas (76). Possui como sinônimas *Cacalia trilobata* Vell., *Mikania glomerata* var. *montana* Hassl., *Mikania hatschbachii* G.M. Barroso e *Mikania scansoria* DC (77).

Outra espécie da mesma família e gênero, a *Mikania laevigata*, frequentemente é comercializada de forma indistinta da *M. glomerata*. As duas espécies, além de compartilharem mesma nomenclatura popular, estão frequentemente presentes no mesmo habitat, possuem mesmo uso terapêutico e morfologia e composição química semelhantes (78).

Na medicina tradicional as folhas da *M. glomerata* são utilizadas principalmente para tratamento de afecções do trato respiratório como gripes, bronquites e tosses (52,79–84). Também há relatos da sua utilização como antiofídico e para o tratamento de reumatismos (81,83), doenças cardiovasculares (81) e malária (82).

As evidências científicas de sua eficácia são provenientes de estudos não clínicos. Os estudos foram realizados com diversos tipos de extrato (aquoso, etanólico, hidroalcoólico, metanólico, diclorometanólico e hexânico), utilizando predominantemente as folhas. Foi observado um potencial terapêutico como antiofídico (85,86), antialérgico (87), antiparasitário (88–90), anti-inflamatório (91,92), ansiolítico (93), antidiarreico (94), antifúngico (95,96), antibacteriano (97) e broncodilatador (98).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 2 de 13 de maio de 2014, na lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* são tratadas em conjunto, com indicação terapêutica de expectorante e broncodilatador (99). A *M. glomerata* também está presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira – 1ª edição, onde constam formulações para preparações extemporâneas, tintura e xarope (100).

Na composição química dos derivados vegetais da espécie *M. glomerata* encontram-se cumarinas, esteroides, heterosídeos flavônicos, derivados do ácido cinâmico, triterpenos, diterpenos do tipo caurano e traços de saponinas (93,101–106). Dentre esses compostos, a cumarina e o diterpeno do tipo caurano são listados como os principais responsáveis pela atividade farmacológica, sendo a cumarina (104,107) utilizada como marcador para a espécie (99).

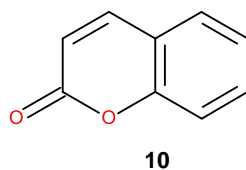


Figura 4 - Estrutura química da cumarina (10)

2.3.4 *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

A *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC ou *Nauclea tomentosa* Willd, conhecida popularmente como Unha de gato, pertence à família Rubiaceae (108) e é uma trepadeira lenhosa nativa da Amazônia. Ocorre, principalmente, em floresta ciliar e floresta estacional perenifolia (109). A planta alcança altura de 18 a 19 metros, possui folhas ovaladas e espículas em formato de gancho, semelhantes às unhas dos gatos. As cascas dos caules contêm numerosas fibras de até 7 cm de comprimento (110).

A espécie está presente na RENAME 2014 com a indicação de coadjuvante nos casos de artrites e osteoartrite, apresentando ação anti-inflamatória e imunomoduladora (8). Tais ações são comprovadas na literatura científica por meio de estudos clínicos e não clínicos (110–113). Além disso, estudos clínicos também indicam sua utilização como coadjuvante no tratamento de câncer, aumentando a qualidade de vida do paciente (114,115).

Os constituintes químicos da espécie incluem polifenóis, glicosídeos do ácido quinóico e alcaloides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos (116–120). A literatura relata a presença de dois quimiotipos principais da espécie *U. tomentosa*. Um quimiotipo com predominância de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina) e outro com predominância de alcaloides oxindólicos tetracíclicos (rincofilina e isorincofilina) (121,122).

De acordo com literatura, a diferenciação dos dois quimiotipos para a obtenção de extratos com finalidade terapêutica é essencial. Os alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), especialmente a mitrafilina, parecem estar mais associados à atividade biológica da planta (111,123–127), enquanto os alcaloides oxindólicos

tetracíclicos (AOT) possuem um efeito antagonista em relação aos pentacíclicos (128,129).

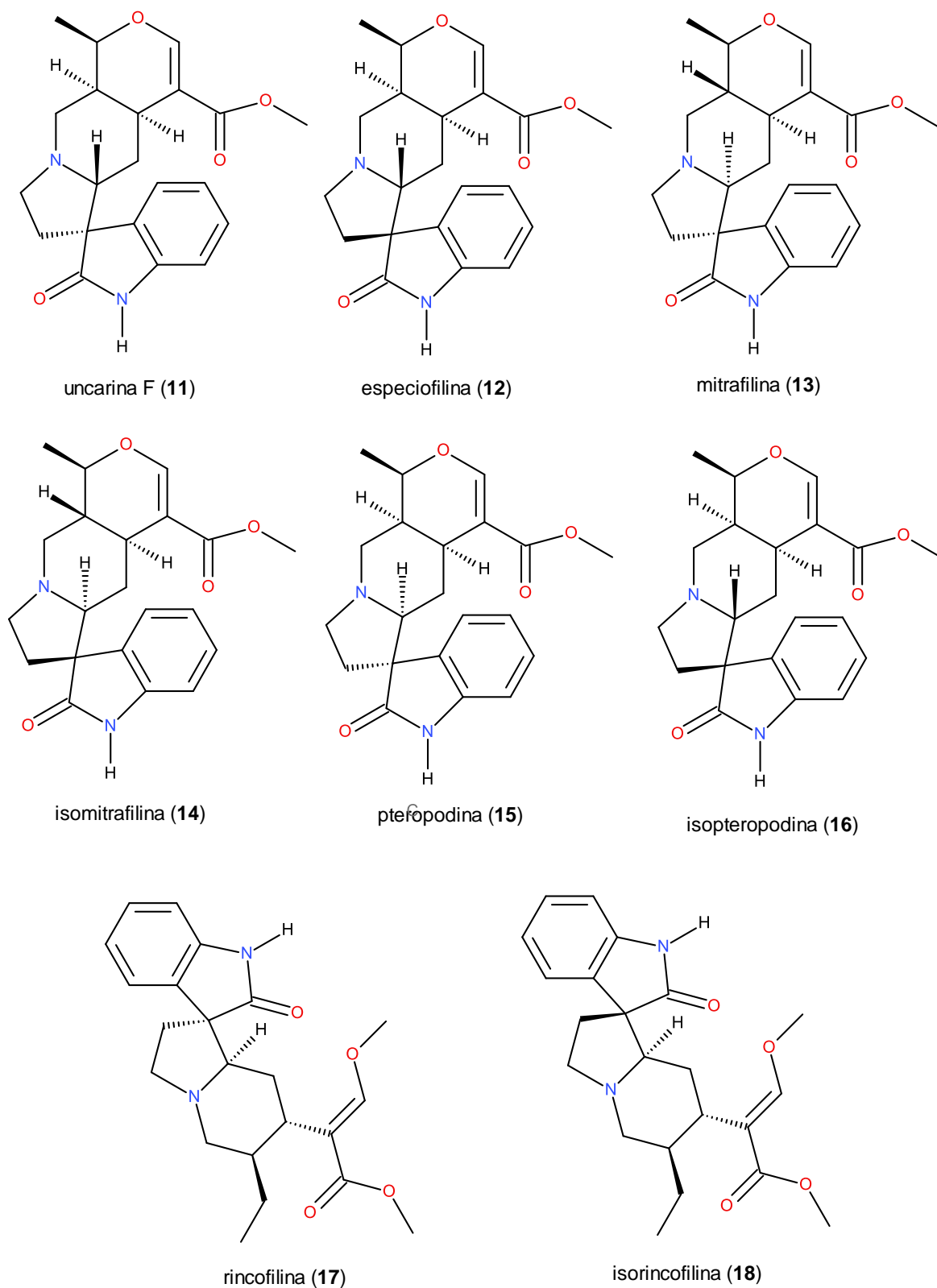


Figura 5 - Principais alcaloides encontrados da espécie *Uncaria tomentosa*

A Farmacopeia do Estados Unidos – USP 39 NF 34, disponibiliza um método para identificação e quantificação desses compostos por CLAE-DAD, que considera a relação entre AOP e AOT (130).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade dos medicamentos fitoterápicos Alcachofra (*Cynara scolymus* L.), Cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.), listados na RENAME 2014, disponíveis no mercado do Distrito Federal e utilizados na atenção à saúde no contexto do SUS (8).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar o tipo de registro e a vigência de registro junto à ANVISA;
- b) Avaliar rótulos e bulas de acordo com RDC específicas;
- c) Avaliar a qualidade dos medicamentos em relação aos seguintes parâmetros:
 - Características organolépticas
 - Peso médio das unidades dos fitoterápicos, quando aplicável
 - pH, densidade e volume médio, quando aplicável
 - Resistência mecânica (friabilidade), quando aplicável
 - Desintegração, quando aplicável
 - Compostos majoritários
 - Marcadores fitoquímicos da espécie vegetal.

4 MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Foram adquiridos, no mercado farmacêutico do Distrito Federal, quantidades suficientes para as análises de três marcas ou, quando não possível, três lotes da mesma marca dos seguintes medicamentos fitoterápicos:

- Alcachofra (*Cynara scolymus* L.);
- Cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.);
- Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.);
- Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC).

4.2 VERIFICAÇÃO DO REGISTRO

A verificação do registro dos fitoterápicos foi realizada na data da compra de cada fitoterápico consultando o banco de dados do portal da Anvisa (131). Além da vigência dos registros, foi observada a consistência entre as informações apresentadas no registro e as informações presentes no rótulo dos medicamentos.

4.3 ANÁLISE DE RÓTULOS E BULAS

A análise de rótulos compreendeu a verificação dos dados exigidos para as embalagens primárias (que mantêm contato direto com o medicamento) e secundárias (embalagem externa do produto, em contato com a embalagem primária), de acordo com a RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009 (132). As bulas foram avaliadas conforme os critérios estabelecidos pela RDC nº 47, de 8 de setembro de 2009, que inclui dados relacionados a identificação do medicamento, informações ao paciente (na forma de perguntas e respostas) e dizeres legais (133). Além disso, as bulas foram comparadas com as bulas-padrão, fornecidas pela Anvisa, quando existentes.

4.4 MÉTODOS GERAIS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

Os métodos gerais para avaliação da qualidade dos fitoterápicos incluíram a determinação do peso médio, densidade, volume, pH, dureza, friabilidade e tempo de desintegração. Todos os métodos foram conduzidos de acordo com a Farmacopeia Brasileira – 5ª edição (FB 5ª ed.) (134).

4.4.1 Caracterização organoléptica

Todas as amostras foram analisadas em relação ao seu aspecto geral, cor e odor. Para isso, foram observadas sobre um fundo branco à luz natural e foram expostas ao ar por 15 minutos para determinar o seu odor (134).

4.4.2 Determinação do peso médio

A determinação do peso médio de comprimidos foi realizada pesando vinte unidades, individualmente, em balança analítica (Shimadzu® - modelo AY220). Posteriormente, o peso médio foi calculado dividindo a somatória dos pesos individuais por vinte. Conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, foram aceitas até duas unidades fora dos limites especificados na tabela a seguir, em relação ao peso médio, porém, nenhuma acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas (134).

Tabela 1 - Critérios de avaliação da determinação do peso de comprimidos, de acordo com a Farmacopeia Brasileira – 5ª edição.

Peso médio	Limites de variação
80 mg ou menos	± 10,0%
Mais que 80 mg e menos que 250 mg	± 7,5%
250 mg ou mais	± 5,0%

Para a determinação do peso médio das cápsulas duras, vinte unidades dos fitoterápicos foram pesadas, individualmente, em balança analítica. Em seguida, o conteúdo de cada cápsula foi removido, as cápsulas foram limpas e pesadas novamente. A diferença do peso entre a cápsula cheia e vazia forneceu o peso do conteúdo de cada cápsula. Desta forma, o peso médio do conteúdo foi obtido com a divisão do somatório dos pesos individuais por vinte (134).

Foram aceitas até duas unidades fora dos limites especificados na tabela 2, em relação ao peso médio do conteúdo, porém, nenhuma acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas na tabela (134).

Tabela 2 - Critérios de avaliação da determinação do peso de cápsulas, de acordo com a Farmacopeia Brasileira – 5ª edição.

Peso médio	Limites de variação
< 300 mg	± 10,0%
300 mg ou mais	± 7,5%

4.4.3 Determinação da resistência mecânica de comprimidos

A resistência mecânica dos comprimidos foi determinada pelo teste de friabilidade. Foram utilizados vinte comprimidos quando o peso médio foi igual ou inferior a 0,65g, ou dez comprimidos quando o peso médio foi superior a 0,65g. Depois de pesados, os comprimidos foram submetidos à ação do friabilômetro (Nova Ética® - modelo 300), a 25 rotações por minuto, durante 4 minutos. Ao final, após remover os resíduos de pó da superfície dos comprimidos, esses foram pesados novamente (134).

A diferença entre o peso inicial e o final representou a friabilidade, medida em função da porcentagem do pó perdido. Como critério de aceitação, os comprimidos não podiam apresentar-se quebrados, lascados, rachados ou partidos. Além disso, foram aceitos aqueles com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso (134).

4.4.4 Determinação da densidade e volume

Para a determinação do volume dos xaropes, primeiramente foi determinado o peso dos conteúdos dos recipientes. Depois de remover lacres e rótulos que poderiam sofrer danos durante o teste, cada recipiente com as respectivas tampas, foi pesado, individualmente, em balança analítica. Posteriormente, os conteúdos foram homogeneizados, removidos e reservados para a determinação da densidade e do pH. Os recipientes vazios foram lavados com água, seguida de etanol, secados em estufa a 105 °C por uma hora e esfriados à temperatura ambiente até peso constante. Foi realizada uma nova pesagem com os recipientes vazios e respectivas tampas. A diferença entre o peso do recipiente cheio e vazio representou o peso dos conteúdos (134).

Para o posterior cálculo do volume, as densidades de massa dos xaropes foram determinadas. Um picnômetro foi pesado vazio e posteriormente, com água destilada a 20°C. Depois de esvaziado e seco, o picnômetro foi preenchido com a amostra do xarope a 20°C e pesado. A razão entre a massa da amostra e a massa da água, ambas a 20°C, determinou a densidade relativa (d) dos xaropes. Para o cálculo da densidade de massa (ρ) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$P = 0,99820 \times d + 0,0012$$

Em que:

P = densidade de massa;
 d = densidade relativa.

Por fim, a partir do peso dos conteúdos e da densidade de massa, os volumes, em mL, foram determinados, utilizando a expressão:

$$V = \frac{m}{\rho}$$

Em que:

m = peso do conteúdo em gramas;
 ρ = densidade de massa da amostra, em g/mL (determinado a 20°C) (134).

Para que as amostras fossem consideradas dentro do padrão estabelecido pela FB 5ª ed., o volume médio não deveria ser inferior ao volume declarado e o volume individual de nenhum dos recipientes testados inferior a 95% do volume declarado (134).

4.4.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada com potenciômetro (JENWAY® - 3510 pH Meter) calibrado previamente com soluções tampão de pH 7, 4 e 10.

4.4.6 Determinação da viscosidade

Para a determinação da viscosidade foi medida a resistência ao movimento de rotação de eixos metálicos imersos no líquido, sob a temperatura de 25 °C, utilizando o viscosímetro Brookfield (BrasEq - modelo RVDV-E), contando com 6 diferentes eixos metálicos.

Para a escolha do eixo adequado, estes foram testados para se obter um valor de torque (força) de 10 a 100%. O eixo escolhido foi mergulhado em aproximadamente 250 mL de amostra contida em um béquer, tomando-se o cuidado para evitar a formação de bolhas. A viscosidade foi dada na unidade de centipoise (cP).

4.4.7 Teste de desintegração

Os testes de desintegração de cápsulas e comprimidos foram realizados utilizando o Desintegrador – Nova Ética® - modelo 301-6, equipado com um sistema de cestas e tubos, recipiente para líquido de imersão, termostato e mecanismo de movimentação vertical para as cestas e tubos com frequência constante.

Seis comprimidos ou cápsulas foram colocados em cada um dos seis tubos da cesta. No caso dos comprimidos foi acrescentado um disco a cada tubo. Água, mantida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, foi utilizada como líquido de imersão. O movimento das cestas foi interrompido quando todos os comprimidos ou cápsulas encontravam-se totalmente desintegrados, permanecendo na tela metálica do tubo apenas fragmentos insolúveis de invólucros de cápsulas ou massas pastosas sem núcleo palpável (134).

Como critério de aprovação, a FB 5ª ed. estabelece o tempo limite de 30 minutos para os comprimidos e 45 minutos para as cápsulas gelatinosas (134).

4.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS POR CLAE-DAD

A identificação e quantificação dos marcadores fitoquímicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada utilizando o cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Toquio, Japão) equipado com detector L2455 DAD (Hitachi, Toquio, Japão), injetor L2200, bomba L2130 e forno para coluna L2300. Os dados foram obtidos com o software EZChrom Elite (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.).

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, obtidos da Tedia e Sigma-Aldrich, e a água foi purificada com sistema Milli-Q (Millipore). Todas as análises foram realizadas em triplicata e as amostras foram filtradas com filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

Os métodos específicos para cada fitoterápico foram conforme o estabelecido nas respectivas monografias presentes nas farmacopeias oficiais reconhecidas pela Anvisa ou, quando não disponíveis, a metodologia foi validada.

4.5.1 *Cynara scolymus*

Como não há monografia para a espécie na versão atual da Farmacopeia Brasileira, o ensaio foi realizado de acordo com o método descrito na monografia para a droga vegetal da Farmacopeia Europeia – 7ª edição (European Pharmacopoeia –

EP 7^a ed.). Devido à necessidade da realização de adequações, o método foi revalidado.

4.5.1.1 Descrição geral do método

Foi utilizada a coluna PurospherStar RP C18e (250 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany) com temperatura mantida a 40°C, fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 25 µL e detecção a 330 nm. A fase móvel foi constituída por um gradiente de ácido fosfórico 0,5% (Bomba A) e ácido fosfórico 0,5% em acetonitrila (Bomba B), como detalhado na tabela a seguir (44).

Tabela 3 - Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de *Cynara scolymus*.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0 – 1	92	8
1 – 20	92 → 75	8 → 25
20 – 33	75	25
33 – 35	75 → 0	25 → 100
35 – 40	0 → 92	100 → 8

As amostras referentes aos fitoterápicos foram preparadas na concentração de 4 mg/mL. Para o preparo de amostras em cápsulas, foi pesado o conteúdo de 20 cápsulas e, após homogeneização, foi pesada a quantidade equivalente a 100 mg de extrato de alcachofra. A amostra foi solubilizada em 25 mL de metanol 30%, deixando por 20 minutos no sonicador. No caso dos comprimidos, foi realizado o mesmo processo acrescentando a etapa de pulverização antes da pesagem dos 100 mg equivalentes ao extrato.

Os padrões ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico), ácido criptoclorogênico (ácido 4-O-cafeoilquínico), ácido neoclorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), cinarina (ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico) e ácido cafeico (Sigma-Aldrich®) e os ácidos isoclorogênico A (ácido 3,5 dicafeoilquínico) e isoclorogênico C

(ácido 4,5 dicafeoilquínico) (ChromaDex®), foram preparados na concentração de 25 µg/mL em metanol.

O teor foi calculado por meio da comparação das áreas do pico dos padrões com concentrações conhecidas com as áreas equivalentes (tempo de retenção e espectro similares) na amostra.

4.5.1.2 Validação

O método foi validado em relação aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção, de acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que estabelece o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, e o guia internacional para o setor industrial, Q2B, de validação de procedimentos analíticos.

a) Linearidade

A linearidade dos marcadores foi determinada por regressão linear. Foram realizadas três curvas para cada padrão com seis concentrações diferentes, utilizando diluição com metanol a partir de uma solução estoque. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente para determinação do coeficiente de linearidade (r), intersecção com o eixo y , coeficiente angular e desvio padrão relativo. O coeficiente de linearidade aceitável foi de no mínimo 0,99 (135,136).

b) Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir do desvio padrão da intercepta com o eixo y (DP) e a inclinação da curva de calibração (IC), obtidos a partir das curvas de linearidade. Foram utilizadas as seguintes fórmulas (135,136):

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

c) Precisão

A precisão intracorrida (repetibilidade) foi determinada por meio da análise no CLAE-DAD de seis replicatas de uma amostra do fitoterápico de *C. scolymus*, com 100% de concentração no mesmo dia. A repetibilidade foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), não sendo admitidos valores superiores a 5% (135,136), conforme a seguinte equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que:

DP: desvio padrão;

CMD: concentração média determinada.

d) Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada por CLAE-DAD por meio da indução de hidrólise ácida e básica na amostra. Foram comparadas as médias dos tempos de retenção e áreas dos picos referentes aos marcadores nas amostras com indução de hidrólise ácida ou básica e sem indução de hidrólise.

Após pesar o equivalente a 12 mg de extrato de *C. scolymus* presente no fitoterápico, as amostras foram diluídas em 1 mL de HCl 1 M ou 1 mL de hidróxido de sódio NaOH 1 M e incubadas a 60 °C por 1 hora em banho maria. Depois de resfriadas, as amostras foram neutralizadas com NaOH 1M ou HCl 1M e foi acrescentado 1 mL de metanol, resultando na concentração de 4 mg/mL.

e) Exatidão

A análise de exatidão do método foi realizada pelo método de adição de padrão com 3 concentrações de marcadores: 80, 100 e 120%, em triplicata. Para isso, foi calculada a concentração final de cada marcador na amostra de *C. scolymus* a 100% (4 mg/mL) e posteriormente a 80 e 120%. Estas concentrações deviam ser alcançadas com 500 µL da amostra de *C. scolymus* a 100% adicionada de 500 µL de um *mix* contendo todos os marcadores (ácidos neoclorogênico, clorogênico,

criptoclorogênico, isoclorogênico A e C e cinarina) nas concentrações necessárias para se obter concentração teórica final de 80, 100 e 120% (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações dos padrões e da amostra utilizadas para a obtenção da concentração teórica final na análise de exatidão.

Concentração teórica final ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração na amostra a 4 mg/mL ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração do padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido neoclorogênico		
5,38 (80%)		8,06
6,72 (100%)	2,70	10,74
8,06 (120%)		13,42
Ácido clorogênico		
33,12 (80%)		28,84
41,40 (100%)	41,40	41,40
49,69 (120%)		57,97
Ácido criptoclorogênico		
2,64 (80%)		1,98
3,30 (100%)	3,30	3,30
3,96 (120%)		4,62
Cinarina		
1,10 (80%)		0,82
1,37 (100%)	1,37	1,37
1,64 (120%)		1,92
Ácido isoclorogênico A		
17,77 (80%)		13,33
22,21 (100%)	22,21	22,21
26,66 (120%)		31,10
Ácido isoclorogênico C		
8,22 (80%)		6,17
10,28 (100%)	10,28	10,28
12,33 (120%)		14,39

Como o marcador ácido neoclorogênico apresentou concentração menor do que o limite de quantificação na amostra preparada a 4 mg/mL, foi estabelecida uma

concentração teórica final maior para possibilitar a realização do teste para este marcador. Ou seja, foi necessário adicionar uma maior quantidade deste padrão para que a concentração teórica final fosse atingida.

O preparo das misturas de padrão foi realizado a partir de soluções-mãe a 1 mg/mL de cada padrão, calculando o volume necessário para obtenção de uma solução de 25 mL com a concentração a ser adicionada à amostra (Tabela 4).

Após a injeção das amostras no CLAE-DAD, as concentrações experimentais foram determinadas e a exatidão do método foi expressa pela relação entre a concentração média determinada e a concentração teórica correspondente, e pelo erro padrão relativo (EPR), de acordo com as seguintes fórmulas:

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

$$\text{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

4.5.2 *Rhamnus purshiana*

Para o doseamento de cascarosídeos nos fitoterápicos a base de *R. purshiana*, primeiramente, foi utilizado o método proposto pela EP 7^a ed. Devido às dificuldades encontradas na realização do método, foi proposto outro método de doseamento por CLAE-DAD.

4.5.2.1 Método da Farmacopeia Europeia

Utilizando 20 cápsulas, foi pesado o equivalente a 1 g de extrato e adicionado 100 mL de água fervente, deixando em contato por cinco minutos. Depois de esfriar, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. A amostra foi filtrada, descartando-se os primeiros

20 mL, e 10 mL do filtrado foram transferidos para um funil de separação e adicionado 100 µL de HCl 1 M.

A amostra foi extraída com hexano e éter etílico (3:1) e a extração foi repetida mais duas vezes. As fases orgânicas resultantes da extração foram lavadas com 5 mL de água e a água de lavagem foi acrescentada às fases aquosas combinadas. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi extraída com 30 mL de acetato de etila recentemente saturado com água (150 mL de acetato de etila e 15 mL de água, misturados durante três minutos). A extração foi repetida quatro vezes e as frações orgânicas foram reunidas e utilizadas para o doseamento de glicosídeos hidroxiantracênicos sem cascarosídeos, enquanto as frações aquosas foram utilizadas para o doseamento de cascarosídeos.

Para o doseamento de glicosídeos hidroxiantracênicos sem cascarosídeos, a fase orgânica foi evaporada até resíduo e o resíduo foi dissolvido em 0,4 mL de metanol e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com água e 20 mL da solução foram transferidos para um balão de fundo redondo de 100 mL. Foram adicionados ao balão 2 g de cloreto férrico hexaidratado e 12 mL de HCl 1 M e foi aquecido sob refluxo durante 4 horas.

Após resfriar, a solução foi transferida para um funil de separação e o balão foi lavado com 4 mL de NaOH 1M e em seguida com água. A água de lavagem foi transferida para o funil de separação. Foi realizada extração com 30 mL de hexano e éter etílico (3:1) e repetido três vezes. A fase orgânica foi transferida para outro funil de separação e lavada duas vezes utilizando 10 mL de água em cada lavagem. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi diluída em 100 mL com hexano e éter etílico (3:1), e 20 mL dessa solução foram evaporados até resíduo. O resíduo foi diluído em 10 mL de solução metanólica de acetato de magnésio 5 mg/mL.

A absorvância da solução foi medida em 440 nm e em 515 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. Foi calculada a razão entre os valores de absorvância em 515 nm e em 440 nm. Quando o resultado obtido foi menor que 2,4 o ensaio foi invalidado. O teor de glicosídeos hidroxiantracênicos sem cascarosídeos foi calculado em porcentagem de acordo com a seguinte fórmula:

$$T = \frac{A \times 6,95}{m}$$

Em que:

T= teor de glicosídeos hidroxiantracênicos sem cascarosídeo em porcentagem;

A = absorvância medida em 515 nm;

m = massa em gramas da amostra.

Para o doseamento de cascarosídeos, a fração aquosa reservada para este foi diluída com água em um balão volumétrico de 50 mL e 20 mL dessa solução foram utilizados para proceder como descrito no doseamento de hidroxiantracênicos sem cascarosídeos. Os cálculos realizados também foram os mesmos (44).

4.5.2.2 Identificação por CLAE-DAD

O método proposto, por CLAE-DAD, foi adaptado da literatura (137). A coluna utilizada foi a PurospherStar RP C18 (150 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany), acoplada a pré-coluna de mesmas características. O forno da coluna foi mantido a 25°C, o volume de injeção foi de 25 µL, o fluxo foi mantido a 1 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 297 nm. A fase móvel foi constituída de um sistema isocrático com 70% de ácido acético 1% e 30% de metanol por 25 minutos.

As amostras foram preparadas a partir do conteúdo de 20 cápsulas, pesando o equivalente a 10 mg da quantidade declarada de extrato e diluindo-se em 5 mL de uma solução de metanol 30% para obter a concentração de 2 mg/mL. Devido ao fato de não existir, mercado, o marcador da espécie, o cascarosídeo, foi utilizado como padrão o casantranol (Sigma-Aldrich), que consiste em uma mistura de glicosídeos antracênicos isolados da planta cáscara sagrada. O casantranol foi preparado na concentração de 1 mg/mL em solução de metanol 30%.

4.5.3 *Mikania glomerata*

A identificação e a quantificação de cumarina nas amostras de *M. glomerata* foram realizadas por CLAE-DAD. O método utilizado foi previamente validado no

Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos da UnB (LCQ), considerando parâmetros de linearidade, seletividade, repetibilidade, limite de detecção e quantificação (138).

O detector foi ajustado para a faixa de 220 a 400nm e um cromatograma foi extraído em 276nm. A temperatura foi mantida a 25°C e a coluna utilizada foi a PurospherStar RP C18e (150 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany), acoplada a pré-coluna (4 P 4; 5 mm particlesize, Merck, Germany). Foi utilizado um sistema de eluição isocrática constituído de 37% de ácido fosfórico a 1% (Bomba A) e 63% de acetonitrila (Bomba C). O fluxo da fase móvel foi de 0,6 mL por minuto e o volume de injeção foi de 10 µL.

Para o preparo das amostras, os fitoterápicos foram diluídos na proporção 1:5 em uma mistura de água ultrapura (mili-Q) e acetonitrila a 65% e 35%, respectivamente. Logo após, foram colocados em centrífuga a 12000 rpm por cinco minutos a 25°C. O padrão de cumarina (Sigma-Aldrich) foi diluído em metanol na concentração de 20 µg/mL. O teor de cumarina foi obtido por meio da relação entre a área do pico do padrão com a área do pico equivalente (tempo de retenção e espectro similar) na amostra.

4.5.4 *Uncaria tomentosa*

As metodologias presentes nas monografias de controle da qualidade para cápsulas e comprimidos de *U. tomentosa* da Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia - USP 39) foram utilizadas para a identificação e quantificação de alcaloides presentes nas amostras de *U. tomentosa* (130).

O cromatógrafo foi equipado com a coluna Nucleosil[®] C18 com partículas de 3 µm e dimensões de 10 cm x 4,6 mm. O volume de injeção foi de 10 µL, o fluxo de 0,75 mL/min e o cromatograma foi extraído em 245 nm. A fase móvel foi constituída por um gradiente de tampão fosfato 10 mM com pH 7 (Bomba A), acetonitrila (Bomba B) e ácido acético glacial 1% em metanol (Bomba C), como apresentado na Tabela 5. O tampão fosfato 10 mM foi preparado misturando NaOH 1M, fosfato de potássio

monobásico 1M e água na proporção de 3:5:492. O pH da solução foi ajustado para 7.

Tabela 5 - Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de *U. tomentosa*.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)	Solução C (%)
0 - 17	65	35	0
17 - 25	65 → 50	35 → 50	0
25 - 30	50	50	0
30 - 31	50 → 0	50 → 0	0 → 100
31 - 36	0	0	100
36 - 39	0 → 65	0 → 35	100 → 0
39 - 49	65	35	0

Como substâncias de referência, foram utilizados o padrão de isopteropodina (16) (USP Reference Standard), preparado na concentração de 0,1 mg/mL em metanol, e o extrato padronizado de *U. tomentosa* (USP Reference Standard) preparado em metanol na concentração de 0,5 mg/mL do total declarado de alcaloides oxindólicos.

Para o preparo das amostras, a partir do conteúdo de vinte cápsulas, o equivalente a 20 mg da quantidade declarada de alcaloides totais calculados como mitrafilina foi transferido para um tubo e sonificado por 10 min com 10 mL de metanol. Posteriormente, a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. A extração foi repetida mais três vezes e os extratos foram combinados no balão volumétrico e diluídos com metanol até o volume final. Três mL dessa solução foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 300 mg de pó de poliamida e agitados por um minuto. Por fim, as amostras, preparadas em triplicata, foram filtradas com filtro de 0,45 µm, descartando-se a primeira parte do filtrado.

O cálculo do teor dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafalina, pteropodina e isopteropodina foi realizado comparando a área do pico do padrão de isopteropodina, de concentração conhecida, com a área do pico correspondente a cada marcador. As quantidades individuais de cada marcador foram somadas para ser obtido o total de alcaloides oxindólicos pentacíclicos.

Também foi calculada a porcentagem de alcaloides oxindólicos tetracíclicos em relação ao conteúdo total de pentacíclicos. O resultado foi obtido relacionando a soma das áreas dos picos correspondentes à rincofilina e à isorincofilina com a soma das áreas dos picos correspondentes aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para este método foram utilizadas placas de alumínio recobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich). As amostras e padrões foram aplicados na placa cromatográfica com auxílio de um tubo capilar e, após a aplicação, as placas foram colocadas em uma cuba saturada com a solução eluente. Finalizada a eluição, foi utilizada uma solução reveladora para elucidar a presença dos compostos.

Por fim, as placas cromatográficas foram colocadas em exposição à luz ultravioleta a 365 nm e o fator de retenção (R_f) de cada ponto foi calculado para comparação com os padrões. Os eluentes e os reveladores foram escolhidos de acordo com a classe do composto ao qual o marcador pertencia, conforme o estabelecido por Wagner e Bladt (139).

4.6.1 *Cynara scolymus*

A CCD dos fitoterápicos a base de alcachofra foi realizada para verificar a presença dos compostos ácido clorogênico e luteolina-7-glicosídeo. Foi utilizada, como eluente, uma solução de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água na proporção de 100:11:11:26. A placa foi aquecida a 100°C por 5 minutos e revelada com o reagente NP/PEG, constituído de duas soluções: solução metanólica de difenilboriloxietilamina 1% (NP) e solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (PEG) a 5% (139). As amostras foram preparadas na concentração de 4 mg/mL em metanol 30%, enquanto o padrão de ácido clorogênico foi preparado na concentração de 50 µg/mL em metanol.

4.6.2 *Rhamnus purshiana*

A determinação dos compostos majoritários da cáscara-sagrada por CCD foi realizada com a utilização do eluente composto pela mistura de acetato de etila, metanol e água na proporção de 39:7:4. A placa foi revelada com NP/PEG, conforme especificado no item anterior (139). As amostras correspondentes a cada lote foram preparadas na concentração de 2 mg/mL e o casantranol, utilizado como referência, foi preparado na concentração de 1 mg/mL. Foi verificada a presença de cascarosídeos e aloína.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

De acordo com a disponibilidade dos medicamentos no mercado farmacêutico do Distrito Federal, foi possível obter amostras de três marcas diferentes dos fitoterápicos a base de *C. scolymus* e de *M. glomerata* e duas marcas dos fitoterápicos de *U. tomentosa*, porém, pela falta de variedade, foram obtidas amostras de três lotes diferentes de apenas uma marca do fitoterápico a base de *R. purshiana*. A Tabela 6 detalha os fitoterápicos obtidos e suas especificações.

Tabela 6 - Medicamentos fitoterápicos obtidos e suas especificações

Fitoterápico	Marca/ Lote	Forma farmacêutica	Concentração do derivado vegetal
<i>Cynara scolymus</i> L.	A	Comp. revestido	200 mg
	B	Comprimido	335 mg
	C	Cápsula dura	300 mg
<i>Rhamnus purshiana</i> DC. / <i>Frangula purshiana</i>	L1/ L2/ L3	Cápsula dura	75 mg
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	A	Solução oral	81,5 mg/mL
	B	Xarope	117,6 mg/mL
	C	Xarope	0,0117 mL/mL
<i>Uncaria tomentosa</i> (Wild.) DC	A	Comp. revestido	100 mg
	B	Cápsula dura	100 mg

Comp.: Comprimido

Duas amostras de *C. scolymus* se apresentaram na forma de comprimidos e uma na forma de cápsula dura. Todas elas diferiram em relação à concentração do derivado vegetal e a concentração declarada de marcador. Porém, todas apresentaram a mesma indicação terapêutica: colagogo e colerético.

Em relação às amostras de *U. tomentosa*, a marca A estava na forma de comprimido, com indicação terapêutica de anti-inflamatório e foi o único medicamento obtido como uso sob prescrição médica. A marca B se apresentou na forma de cápsulas com indicação terapêutica de anti-inflamatório e antirreumático. Os dois apresentavam concentrações iguais do derivado vegetal e distintas concentrações declarada de marcador.

As amostras de *M. glomerata* foram constituídas de xarope ou solução oral, com diferentes concentrações do derivado vegetal e concentrações declaradas de marcador. Além disso, todas as amostras apresentaram a mesma indicação terapêutica: expectorante e broncodilatador.

A única marca obtida do fitoterápico cáscara-sagrada apresentou-se na forma de cápsula com indicação de laxativo. O lote LA apresentou como nomenclatura botânica *Rhamnus purshiana*, enquanto os lotes LB e LC apresentaram nova nomenclatura botânica: *Frangula purshiana*, considerada como sinonímia (140).

5.2 VERIFICAÇÃO DO REGISTRO

A verificação da vigência dos registros foi realizada na data da compra de cada fitoterápico. Apenas um dos fitoterápicos obtidos encontrava-se com o registro vencido. Após verificar que o vencimento do registro da marca A de *C. scolymus* datava em maio de 2011, foi realizada uma consulta à ouvidoria do portal da Anvisa, na qual foi relatado que este produto protocolizou o pedido de renovação de registro em tempo hábil, porém o pedido foi indeferido em junho de 2013, como a fabricação do fitoterápico adquirido ocorreu após esse período, este encontra-se em situação irregular.

Em relação ao fitoterápico da marca C de *M. glomerata*, que também tinha data de vencimento do registro anterior à data da compra, foi realizada uma consulta à ouvidoria da Anvisa, que informou que a última renovação do registro havia sido indeferida, porém o recurso administrativo que impugna esta decisão aguardava análise quanto à sua admissibilidade. Desta forma, a decisão de indeferimento encontrava-se com efeito suspensivo e o registro continuava válido.

Além disso, ainda em relação ao fitoterápico *M. glomerata* da marca C, foram verificadas inconsistências entre as informações presentes na embalagem do medicamento e as informações contidas no registro. De acordo com o registro, o medicamento deveria estar na concentração de 11,7 mL/mL, enquanto a embalagem traz a informação de 0,0117 mL/mL.

Todos os demais medicamentos consultados apresentavam os respectivos registros dentro de seu prazo de validade, como detalhado na Tabela 7:

Tabela 7 - Vigência dos registros de acordo com portal da Anvisa

Fitoterápico	Marca/ Lote	Situação do registro
<i>Cynara scolymus</i> L.	A	Vencido - Vencimento em 05/2011
	B	Vigente – vencimento em 07/2016
	C	Vigente – vencimento em 06/2018
<i>Rhamnus purshiana</i> DC.	LA/ LB/ LC	Vigente – vencimento em 05/2017
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	A	Vigente – vencimento em 08/2017
	B	Vigente – vencimento em 04/2016
	C	Válido – vencimento em 02/2013*
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC	A	Vigente - vencimento em 09/2017
	B	Vigente – vencimento em 10/2018

* registro válido enquanto aguarda análise de recurso que impugna indeferimento da renovação do registro.

A comercialização de medicamentos com registro vencido configura infração sanitária, prevista na Lei 6.437/1977, com pena de advertência, apreensão, inutilização, interdição e/ou multa (141). A disponibilidade desses produtos nos estabelecimentos indica o descuido de drogarias e farmácias, que expõem a população a riscos de saúde, e a falta de fiscalização por parte da vigilância sanitária.

Apesar de a população ter acesso à verificação do registro de medicamentos por meio do portal da Anvisa, a maioria desconhece esse recurso. Portanto, a atuação da vigilância sanitária é essencial. Além disso, farmácias e drogarias, como

estabelecimentos de saúde, devem considerar todos os riscos envolvidos ao disponibilizar um medicamento, não os tratando apenas como itens varejo (142).

5.3 ANÁLISE DE RÓTULOS E BULAS

Ao analisar as embalagens primárias dos medicamentos fitoterápicos foi verificado que 77,78% das embalagens analisadas apresentaram todas as informações requeridas pela RDC 71/2009. As irregularidades encontradas foram em relação à ausência da concentração do derivado vegetal (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise de embalagens primárias dos medicamentos fitoterápicos de acordo com a RDC 71/2009

Dados exigidos	<i>C. scolymus</i>			<i>M. glomerata</i>			<i>U. tomentosa</i>		<i>R. purshiana</i>
	A	B	C	A	B	C	A	B	L1/L2/L3
Nome comercial	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Nomenclatura botânica	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Concentração do derivado vegetal	P	P	A	P	P	P	P	A	P
Via de administração	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Nome do titular do registro	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Telefone do SAC	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P: informação presente; A: informação ausente

Em relação às embalagens secundárias, foi observado que 55,55% das embalagens apresentaram todos os requisitos exigidos pela RDC 71/2009, porém, apenas 44,44% do total de embalagens analisadas além de apresentarem todas as informações, também foram apresentadas adequadamente, no formato requerido.

Apesar de estarem registrados com mesma indicação terapêutica, as amostras de *U. tomentosa* diferiram em relação à restrição de venda. A rotulagem da marca B

Conclusão

Tabela 10 - Análise de embalagens secundárias de acordo com a RDC 71/2009.

Dados exigidos	<i>C. scolymus</i>			<i>M. glomerata</i>			<i>U. tomentosa</i>		<i>R. purshiana</i>
	A	B	C	A	B	C	A	B	LA/LB/LC
Nome e nº CRF do responsável técnico	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Telefone do SAC	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“MS” e nº do registro com	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“...deve ser mantido fora do alcance de crianças”	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“Informações ao paciente, indicações...”	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Lacre ou selo de segurança	P	P	A	P	P	P	P	A	P
Nome comercial em braile	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Tira reativa	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“MEDICAMENTO FITOTERÁPICO”	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Lote e data de fabricação e validade	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“Siga corretamente o modo de usar...” *	P	P	P	P	P	P	NA	P	P
Contraindicação *	P	P	P	P	P	P	NA	A	P
Indicação *	P	P	P	P	P	P	NA	A	P

P: informação presente; I: informação apresentada de forma inadequada; NA: não se aplica; A: informação ausente; *requisitos necessários apenas para os medicamentos comercializados sem a necessidade de prescrição médica.

A análise das bulas revelou que apenas 33,33% das bulas analisadas estavam completas, com todas as informações descritas de forma adequada. De acordo com a RDC 47/2009 as bulas devem estar organizadas em forma de perguntas e respostas, em tópicos, para facilitar o entendimento pelo paciente. Os maiores problemas encontrados foram em relação à organização dessas perguntas e respostas.

A bula da marca A do fitoterápico de *C. scolymus* omitiu alguns tópicos de perguntas e apresentou várias informações incompletas ou em lugares indevidos,

Conclusão

Tabela 12 - Análise de bulas de acordo com a RDC 47/2009 e bulas padrão.

Dados exigidos	<i>C. scolymus</i>			<i>M. glomerata</i>			<i>U. tomentosa</i>		<i>R. purshiana</i>
	A	B	C	A	B	C	A	B	LA/LB/LC
Como este medicamento funciona?	P	P	P	P	P	P	P	I	P
Quando não devo usar este medicamento?	P	P	P	P	P	P	P	I	P
O que devo saber antes de usar este medicamento?	A	I	P	P	I	P	P	A	P
Onde e por quanto tempo posso guardar?	I	P	P	P	P	P	P	I	P
O que devo fazer quando me esquecer de usar?	A	P	P	P	P	P	P	A	P
Quais os males que este medicamento pode me causar?	I	P	P	P	P	P	P	I	P
Como devo usar?	I	P	I	P	P	P	P	I	P
O que fazer se alguém usar uma quantidade maior do que a indicada?	I	P	P	P	P	P	P	I	P
MS e número do registro com 9 dígitos	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Nome e nº do CRF do responsável técnico	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Razão social e endereço da empresa titular do registro	P	P	P	P	P	P	P	P	P
CNPJ do titular do registro	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Telefone do SAC	P	P	P	P	P	P	P	P	P
“Esta bula foi aprovada pela ANVISA em _____”	A	P	P	P	A	P	P	A	P
Símbolo de reciclagem de papel	P	P	P	P	A	P	P	A	P

P: informação presente; I: incompleto ou inadequado; NA: não se aplica; A: informação ausente

Atualmente, a utilização de fitoterápicos ocorre principalmente por meio da automedicação, sem o auxílio de profissionais que forneçam informações sobre o uso correto e consciente desses medicamentos (2,143,144). Dessa forma, rótulos e bulas com informações confiáveis, escritas de forma adequada e de fácil entendimento, possuem papel fundamental na promoção do uso racional, fornecendo importantes

dados como contraindicações, interações medicamentosas, modo de administração e outros (145,146).

A falta de informações e a falta de clareza, encontradas por este trabalho, podem ter como consequência o uso inadequado destes medicamentos e gerar indiretamente eventos adversos. Como exemplo, a falta do item “o que devo saber antes de usar este medicamento?”, que deveria conter informações sobre interações medicamentosas, na bula da marca A de *C. scolymus*, poderia ocasionar a descompensação da pressão arterial em um paciente hipertensivo desavisado que fizer o uso concomitante deste medicamento com diuréticos (147).

Vale ressaltar que os profissionais de saúde, principalmente o farmacêutico, também possuem um papel fundamental nesse sentido. É essencial que estes incentivem a leitura da bula e também estejam capacitados para fornecer orientações adequadas sobre o uso racional de fitoterápicos (148).

5.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

5.4.1 Caracterização organoléptica

A observação das características organolépticas de formas farmacêuticas é simples, podendo ser realizada por qualquer pessoa, e pode ajudar na detecção de desvios na qualidade dos medicamentos. Mudanças na cor e odor, por exemplo, podem representar contaminações com fungos ou bactérias, podendo gerar eventos adversos como consequência.

5.4.1.1 *Cynara scolymus*

As amostras das três marcas de *C. scolymus* apresentaram odor característico semelhante, sendo o da marca B mais acentuado. Os comprimidos revestidos da marca A apresentaram coloração verde escuro de maneira uniforme e os comprimidos

da marca B, verde claro não uniforme, com aparência de desgastados. Provavelmente, o desgaste dos comprimidos pode ter ocorrido devido ao seu acondicionamento. Diferente dos produtos das outras marcas, que vieram acondicionados em blister, os comprimidos da marca B estavam todos em uma garrafa de plástico transparente, na qual foram observados resíduos do medicamento.

Apesar do desgaste dos comprimidos, as características organolépticas, como a cor e o odor, concordaram com o descrito na bula do produto da marca B, enquanto a marca A não apresentou descrição das características organolépticas na bula. Portanto não foi possível realizar essa comparação. A presença desse item na bula é essencial para permitir que o paciente detecte possíveis alterações no produto.

A apresentação do produto da marca C constituiu de cápsula gelatinosa dura incolor contendo pó fino de coloração castanho esverdeado escuro, discordando da coloração verde claro, descrita na bula do medicamento.

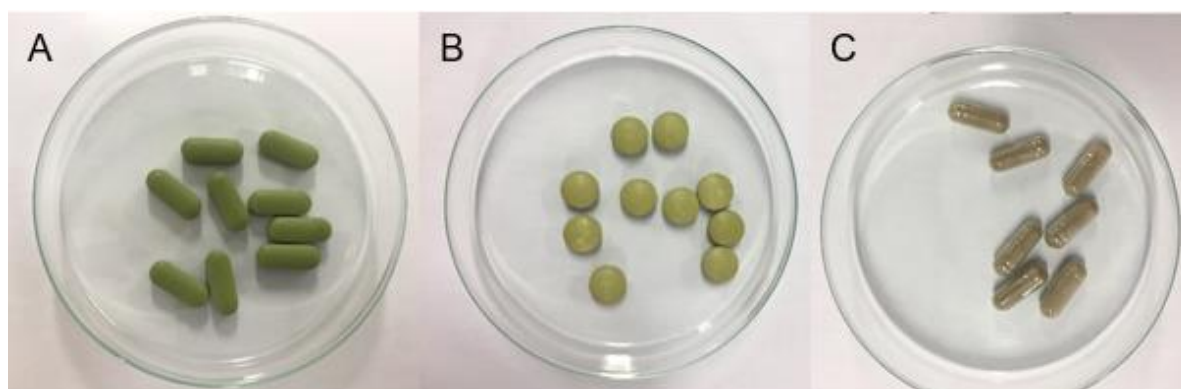


Figura 6 - Amostras das marcas A, B e C dos fitoterápicos de *Cynara scolymus*

5.4.1.2 *Rhamnus purshiana*

As cápsulas dos lotes A, B e C do fitoterápico de *R. purshiana*, apresentaram-se semelhantes, na cor creme e odor característico leve, assim como descrito na bula do medicamento.

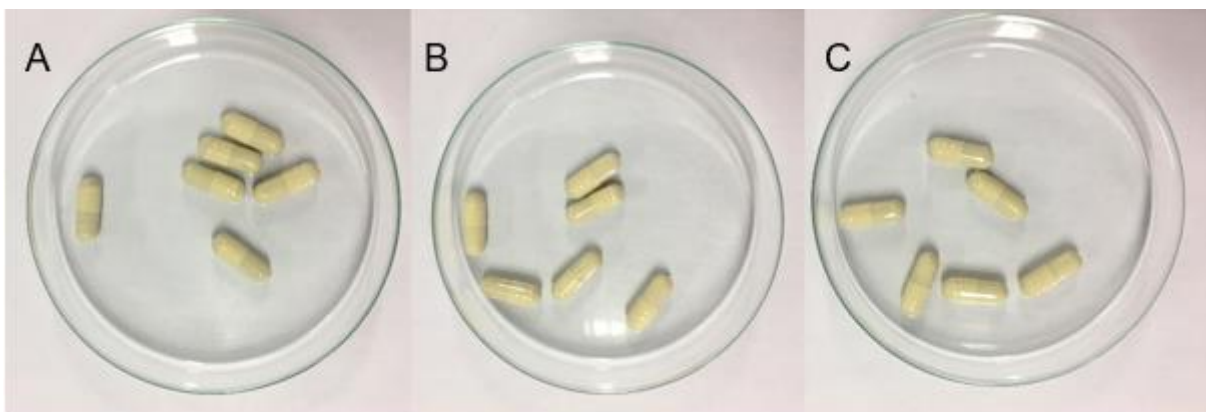


Figura 7 - Amostras dos lotes A, B e C do fitoterápico de *Rhamnus purshiana*

5.4.1.3 *Mikania glomerata*

Em relação à cor, os produtos das marcas A e B exibiram uma cor mais acastanhada, enquanto o produto da marca C exibiu uma coloração amarelada, mais clara em relação às outras. Também foi possível visualizar o aspecto mais opaco das amostras A e C e mais translúcido da amostra B (Figura 8). As três amostras

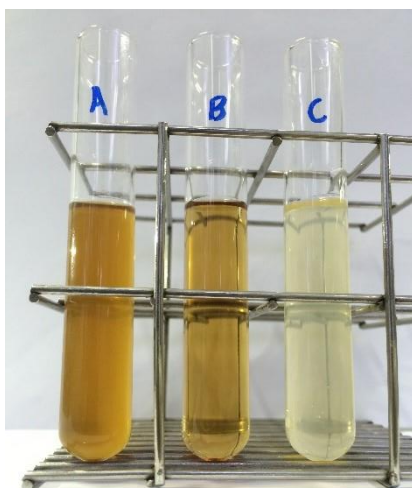


Figura 8 - Amostras das marcas A, B e C dos fitoterápicos de *Mikania glomerata* apresentaram um odor característico, sendo o odor da amostra C mais leve em relação às outras.

5.4.1.4 *Uncaria tomentosa*

Os comprimidos da marca A de *U. tomentosa* possuíam cor castanha com pontos avermelhados de maneira uniforme e odor acentuado característico, semelhante à descrição na bula, enquanto o produto da marca B, apresentou-se na forma de cápsula incolor contendo pó fino de coloração uniforme castanha e com odor quase imperceptível. Esse produto também não apresentou descrição de suas características na bula, não permitindo a comparação.

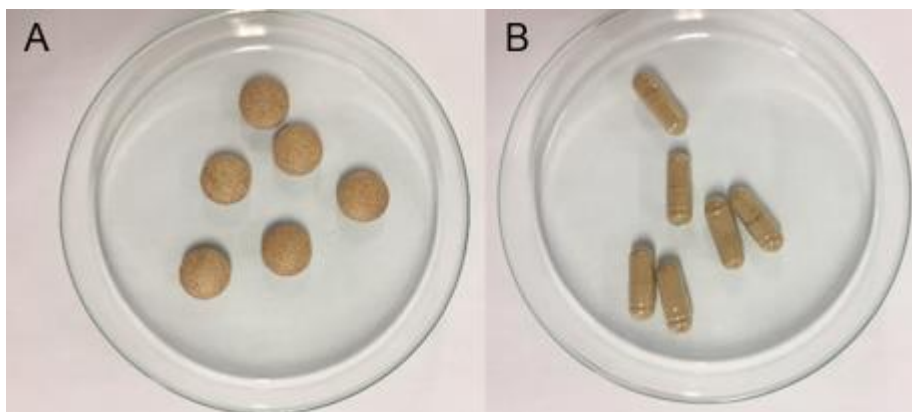


Figura 9 - Amostras das marcas A e B dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa*

5.4.2 Determinação do peso médio

A Tabela 11 apresenta os pesos médios das amostras, variação aceitável e as variações máximas. Considerando os limites de variação permitidos, de acordo com a FB 5^a ed., apenas a marca B de *U. tomentosa* não estava em conformidade com os critérios de aceitação, tendo em vista que o conteúdo de uma das cápsulas apresentou uma variação maior que o dobro da variação permitida. Grandes variações no peso podem significar também variações na quantidade de princípio ativo, podendo afetar a eficácia e segurança do tratamento.

Tabela 13 - Peso médio avaliado conforme os critérios estabelecidos na Farmacopeia Brasileira – 5ª edição

	Marca / lote	PM (mg)	DP	CV (%)	Varição aceitável	Varição máxima
<i>C. scolymus</i>	A	685,88	9,47	1,38	± 5%	+2,62% e - 2,09%
	B	617,07	4,65	0,75	± 5%	+1,30% e -1,39%
	C	363,43	3,05	0,84	± 7,5%	+ 1,78% e - 0,75%
<i>R. purshiana</i>	A	270,26	2,39	0,88	± 10%	+ 1,46% e - 1,32%
	B	271,47	6,68	2,46	± 10%	+ 4,32% e - 3,08%
	C	272,91	6,71	2,46	± 10%	+ 4,17% e - 4,00%
<i>U. tomentosa</i>	A	641,74	6,56	1,02	± 5%	+ 2,03% e -2,73%
	B	305,1	16,81	5,51	± 7,5%	+18,09% e - 6,75%

PM: Peso médio; DP: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação

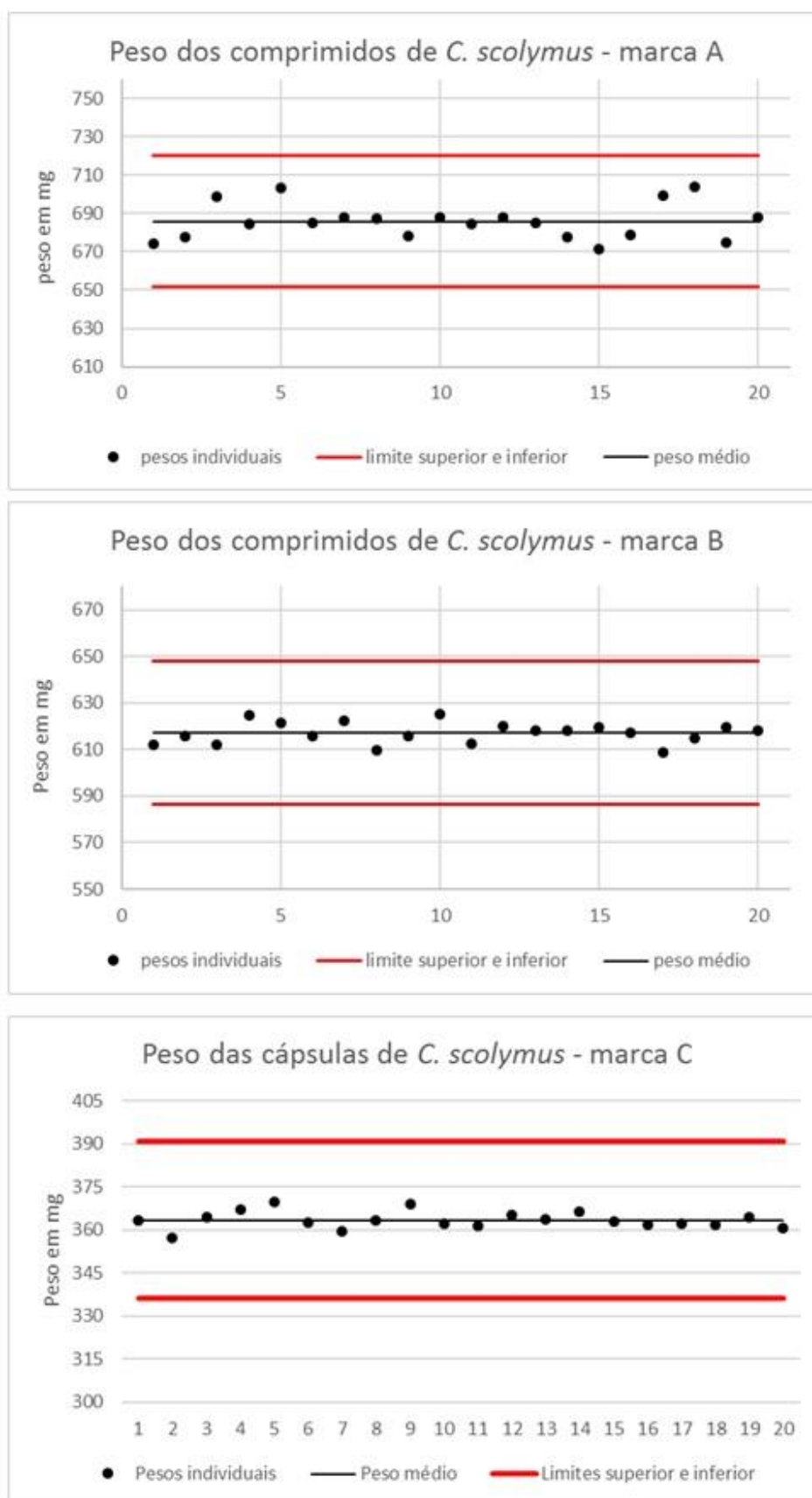


Figura 10 - Peso dos comprimidos e cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de *Cynara scolymus*

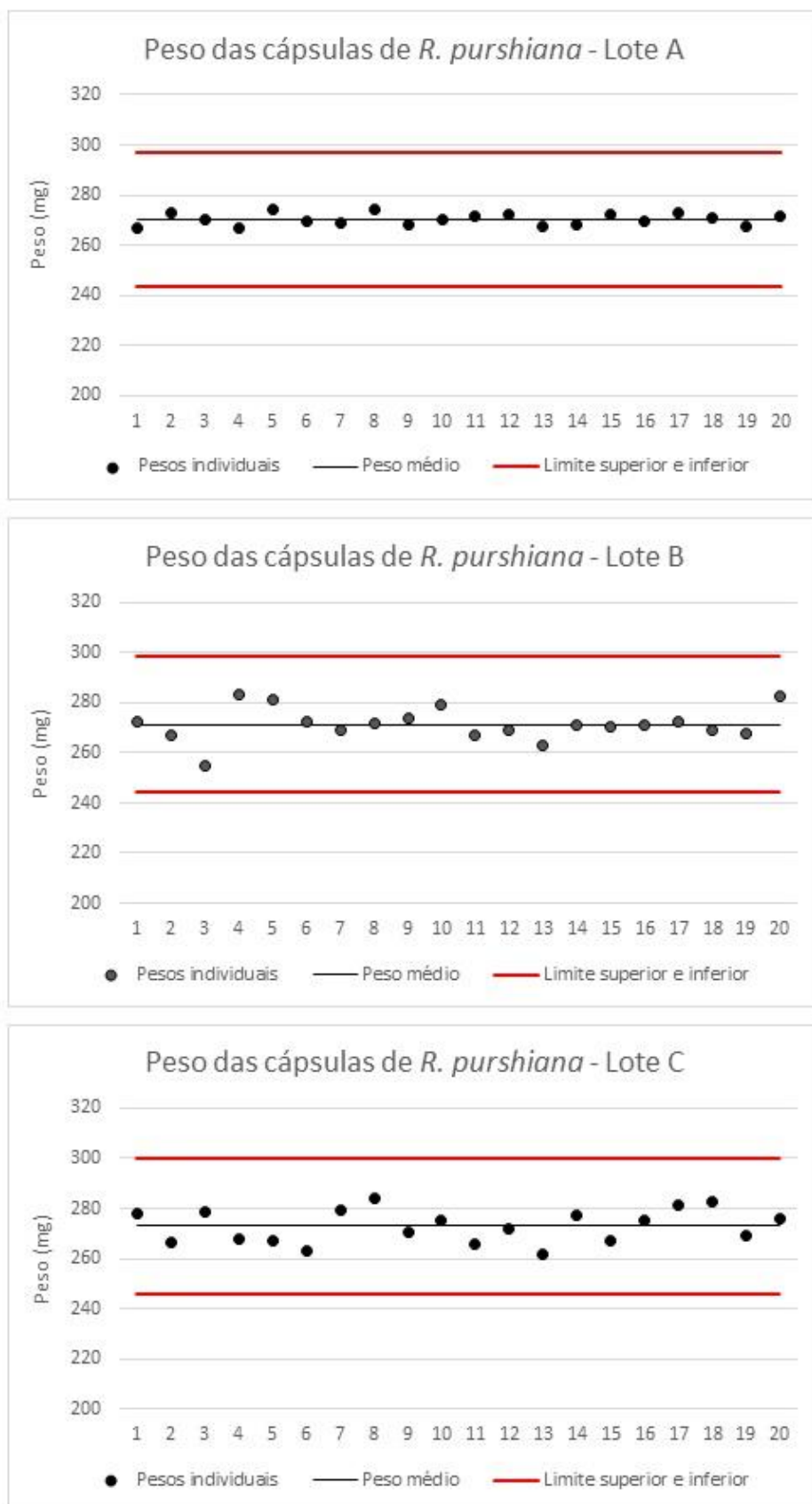


Figura 11 - Peso do conteúdo das cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de *Rhamnus purshiana*.

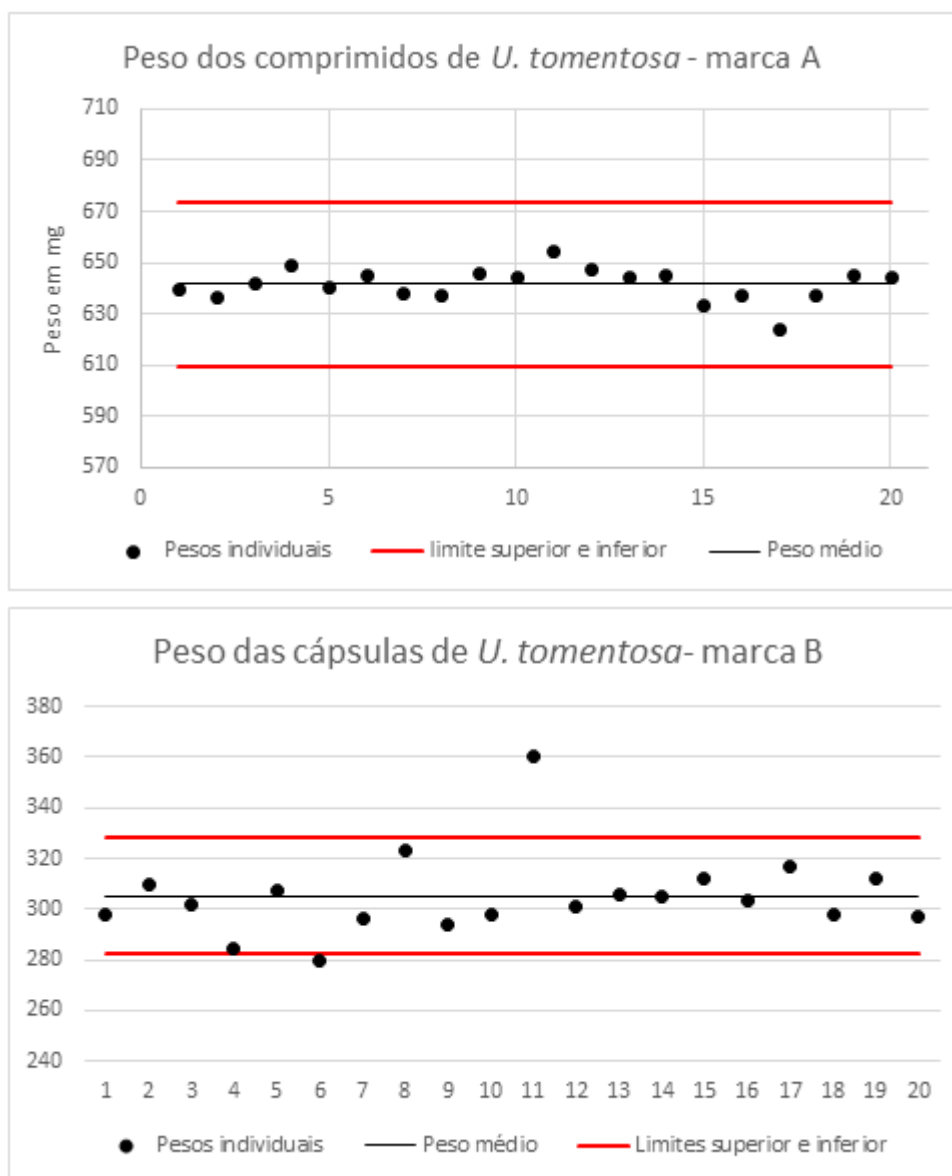


Figura 12 - Peso dos comprimidos e cápsulas e limites de variação dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa*

5.4.3 Determinação da resistência mecânica de comprimidos

Durante toda a cadeia produtiva do medicamento até o manuseio pelo paciente, os comprimidos estão sujeitos a choques mecânicos que podem causar sua ruptura e desgaste. O teste de friabilidade, descrito na FB 5ª ed, possibilita a determinação da resistência de comprimidos não revestidos à abrasão.

Apenas a marca B de *C. scolymus* se apresentou na forma de comprimido não revestido, portanto foi a única submetida ao teste. De acordo com a FB 5ª ed., quando

o peso médio dos comprimidos é acima de 0,65 g, são utilizados 20 comprimidos no teste.

Ao final, nenhuma das amostras analisadas estava quebrada, lascada, rachada ou partida. Além disso, a porcentagem de perda de pó foi de 0,32%, inferior ao limite de 1,5% especificado na farmacopeia.

5.4.4 Determinação da densidade, volume e pH

Somente foram submetidas à determinação da densidade, volume e pH as amostras de *M. glomerata*, que foram as únicas em forma farmacêutica líquida. Apenas uma das três marcas obtidas de *M. glomerata* apresentou irregularidade em relação aos critérios exigidos pela FB 5ª ed. Foi constatado um volume médio de 118,87 mL, inferior ao volume declarado (120 mL). Porém, nenhum dos volumes individuais foi inferior a 95% do volume declarado.

Em relação ao pH e à densidade, a FB 5ª ed. não estabelece critérios. Todas as amostras apresentaram uma faixa próxima de densidade e pH, semelhante ao encontrado em estudo envolvendo amostras de *M. glomerata* (149).

Tabela 14 - Volume, densidade e pH das amostras de *Mikania glomerata*

Marca	Volume declarado (mL)	Volume individual (mL)	Volume médio (mL)	Densidade	pH
A	120	118,92	118,87	1,04831	5,17
		118,83			
		118,84			
B	150	150,81	151,323	1,02022	5,88
		151,97			
		154,24			
C	150	152,18	152,04	1,23819	5,14
		151,66			
		152,29			

5.4.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade é um parâmetro importante na avaliação de formas farmacêuticas líquidas de uso oral, pois pode interferir na estabilidade, no paladar e na absorção do fármaco, influenciando na velocidade de disponibilização do princípio ativo (150,151). A determinação da viscosidade foi realizada no viscosímetro de Brookfield, sob temperatura de 25°C, com o *spindle* (eixo) adequado para cada amostra, no qual o torque apresentava-se entre 10 e 100%, com 100 rotações por minuto (rpm).

Foi verificada uma grande diferença entre a viscosidade dos produtos de cada marca, sendo a viscosidade da marca C superior à marca A (Tabela 13). A alta viscosidade do produto da marca C é característica da forma farmacêutica do produto (xarope), que apresenta grandes quantidades de sacarose ou outros açúcares em sua composição (134).

Também era esperado que o produto da marca B, que também é um xarope, possuísse uma alta viscosidade. Porém, foi observada uma baixa viscosidade para este produto, não sendo possível encontrar um *spindle* adequado para a obtenção do valor de sua viscosidade.

Tabela 15 - Viscosidade das amostras de *Mikania glomerata*

Marca	<i>Spindle</i>	Torque	Viscosidade (cP)
A	02	16,2	64,6
C	05	17,0	678,0

5.4.6 Determinação do tempo de desintegração

Após a ingestão de comprimidos e cápsulas, é necessário que estes se desintegram para possibilitar a sua dissolução e absorção pelo organismo (152). O

teste de desintegração permite determinar o tempo que comprimidos e cápsulas levam para se desintegrar em determinadas condições.

A FB 5ª ed. estabelece o limite máximo de 30 minutos para comprimidos e 45 minutos para cápsulas. Os comprimidos e cápsulas testados apresentaram tempo de desintegração entre 57 segundos e 16 minutos e 21 segundos, dentro dos limites especificados (Tabela 14).

Tabela 16 - Tempo de desintegração dos comprimidos e cápsulas

	Marca/Lote	Forma farmacêutica	Tempo de desintegração
<i>Cynara scolymus</i>	A	Comprimido	4 min
	B	Comprimido	15 min 50 s
	C	Cápsula	16 min 21 s
<i>Rhamnus purshiana</i>	A	Cápsula	14 min 10 s
	B	Cápsula	16 min 7 s
	C	Cápsula	11 min 34 s
<i>Uncaria tomentosa</i>	A	Comprimido	57 s
	B	Cápsula	12 min 7 s

5.5 MÉTODOS ESPECÍFICOS

5.5.1 *Cynara scolymus*

5.5.1.1 Validação do método analítico

Apesar de não possuir monografia específica para a espécie *Cynara scolymus* na Farmacopeia Brasileira, há uma monografia para o extrato seco das folhas na EP 7ª ed. que inclui método para identificação e quantificação de ácido clorogênico por CLAE. Em nota técnica, a Anvisa recomendou a utilização desta metodologia, porém deveriam ser identificados e quantificados os picos referentes a mais oito derivados

cafeoilquínicos. Para tanto, o método deve ser validado parcialmente, a fim de produzir evidências da adequabilidade do método nas condições operacionais do laboratório (64).

Desta forma, foi realizada a validação do método em termos de linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção, seletividade e exatidão para que houvesse a inclusão dos padrões de ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido cafeico, cinarina e ácidos isoclorogênico A e C, além do ácido clorogênico. Os demais derivados cafeoilquínicos não foram incluídos na metodologia por estarem indisponíveis no mercado. Além disso, foi necessário realizar adaptações no procedimento de preparo da amostra para permitir que a análise fosse realizada no produto acabado.

O produto da marca B foi o escolhido para realização das análises de precisão, seletividade e exatidão com base em uma análise prévia, na qual foi detectado que esta amostra apresentava o maior número de marcadores, além de apresentar teores mais elevados em relação aos outros produtos, sendo o mais próximo ao desejável. Estas análises foram realizadas com um lote diferente daquele utilizado para as análises finais de controle da qualidade.

a) Linearidade

A linearidade representa a capacidade da metodologia analítica de demonstrar a proporcionalidade entre os resultados obtidos e a concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado, que é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior (135,136).

Para cada padrão foram realizadas três curvas independentes com 6 concentrações. A determinação da linearidade do ácido clorogênico, cinarina, ácido cafeico, ácido isoclorogênico A e C, ácido neoclorogênico e criptoclorogênico foram avaliadas com as concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 µg/mL.

A partir das médias das áreas dos picos das três curvas, de cada padrão, foi determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) utilizando o programa GraphPadPrism® (Tabela 15).

Tabela 17 - Linearidade dos marcadores do fitoterápico de *Cynara scolymus*.

Padrão	Concentrações	Equação da reta	r
Ácido clorogênico	1 – 50 µg/mL	Y= 203957x - 17409	0,9991
Ácido criptoclorogênico	1 – 50 µg/mL	Y= 268182x + 13926	0,9952
Ácido neoclorogênico	1 – 50 µg/mL	Y= 191859x - 103767	0,9972
Ácido isoclorogênico A	1 – 50 µg/mL	Y= 516598x - 17972	0,9981
Ácido isoclorogênico C	1 – 50 µg/mL	Y= 343767x + 48808	0,9988
Ácido cafeico	1 – 50 µg/mL	Y= 723184x + 48385	0,9973
Cinarina	1 – 50 µg/mL	Y= 355651x + 105198	0,9969

As curvas de regressão linear obtidas (Figura 13) apresentaram linearidade na faixa de concentração testada. Todos os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99, como exigido pela RE 899/2003. Portanto, as curvas demonstraram a proporcionalidade entre as áreas dos picos e a concentração dos marcadores.

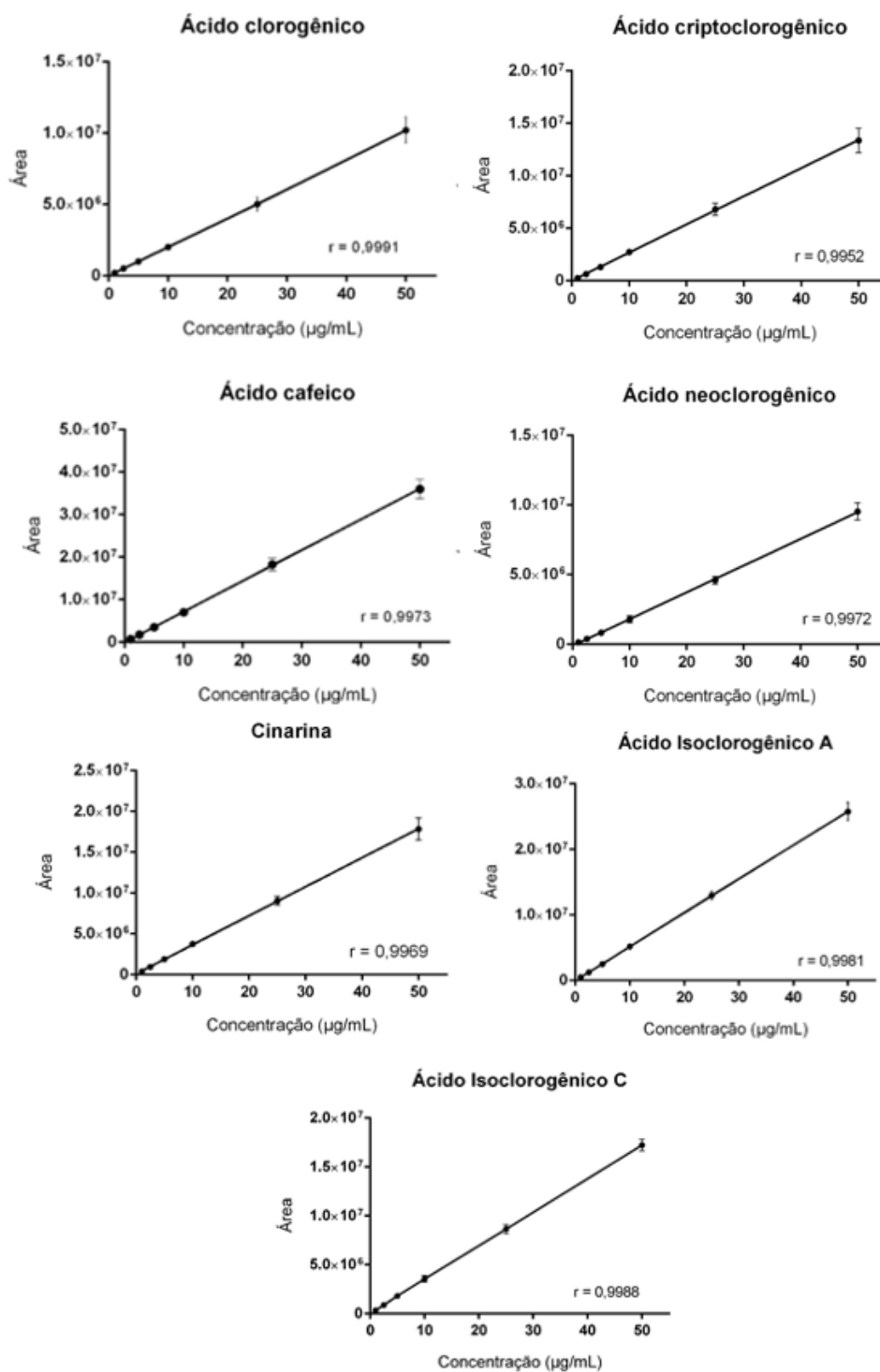


Figura 13 - Curvas de regressão linear dos marcadores de *Cynara scolymus*

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

Os limites de detecção e quantificação representam a menor quantidade da substância que pode ser detectada e quantificada, respectivamente, em uma amostra (135,136). Estes limites foram estabelecidos a partir dos resultados das menores concentrações do ensaio de linearidade. Foram utilizados o desvio padrão da intercepta de Y e a inclinação da reta para a realização dos cálculos. A Tabela 16 apresenta os limites de detecção e quantificação encontrados.

Tabela 18 - Limites de quantificação e detecção dos marcadores de *Cynara scolymus*

Padrão	Concentração	DP int. Y	IC	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Ac. clorogênico	1 – 10 µg/mL	13686	202749	0,20	0,68
Ac. criptoclorogênico	1 – 10 µg/mL	68475	277188	0,74	2,47
Ac. neoclorogênico	1 – 10 µg/mL	64282	184346	1,05	3,49
Ac. isoclorogênico A	1 – 10 µg/mL	127504	521605	0,73	2,44
Ac. isoclorogênico C	1 – 10 µg/mL	94860	356146	0,80	2,66
Ac. cafeico	1 – 10 µg/mL	54322	700732	0,23	0,78
Cinarina	1 – 10 µg/mL	33280	375839	0,27	0,89

DP int. Y: Desvio padrão da intercepta de Y; IC: inclinação da reta; LD: Limite de detecção; LQ: Limite de Quantificação.

c) Precisão

A precisão do método é considerada em diversos níveis e indica a proximidade dos resultados da medição de replicatas de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intercorrida), que visa a concordância entre os resultados obtidos em um curto período, com mesmo analista e mesma instrumentação, foi determinada através da análise de seis amostras do fitoterápico de *C. scolymus* na concentração de 100% do teste (135,136).

Para a análise de precisão do método, a literatura estabelece o máximo de 5% para o desvio padrão relativo (DPR). Todos os marcadores mostraram DPR de 0.90 a

3,31%, dentro do limite de 5% (Tabela 17), demonstrando a precisão do método proposto. O ácido cafeico foi o único marcador que não foi identificado na amostra.

Tabela 19 - Precisão do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos em fitoterápicos de *Cynara scolymus*.

Marcadores	Média das áreas	DPR (%)
Ac. neoclorogênico	498598,17	1,65
Ac. clorogênico	8398475,00	2,22
Ac. criptoclorogênico	900432,33	0,90
Cinarina	495679,00	1,96
Ac. isoclorogênico A	8579828,67	2,94
Ac. isoclorogênico C	3549346,00	3,31

* DPR: Desvio Padrão Relativo

d) Seletividade

A análise de seletividade, de acordo com a RE 899/03, permite verificar a capacidade do método em medir exatamente um composto em presença de outras substâncias como impurezas e produtos de degradação (135). Amostras foram submetidas a um processo de estresse, por meio da indução de hidrólise ácida ou básica, e foram comparadas com a mesma amostra sem indução de hidrólise.

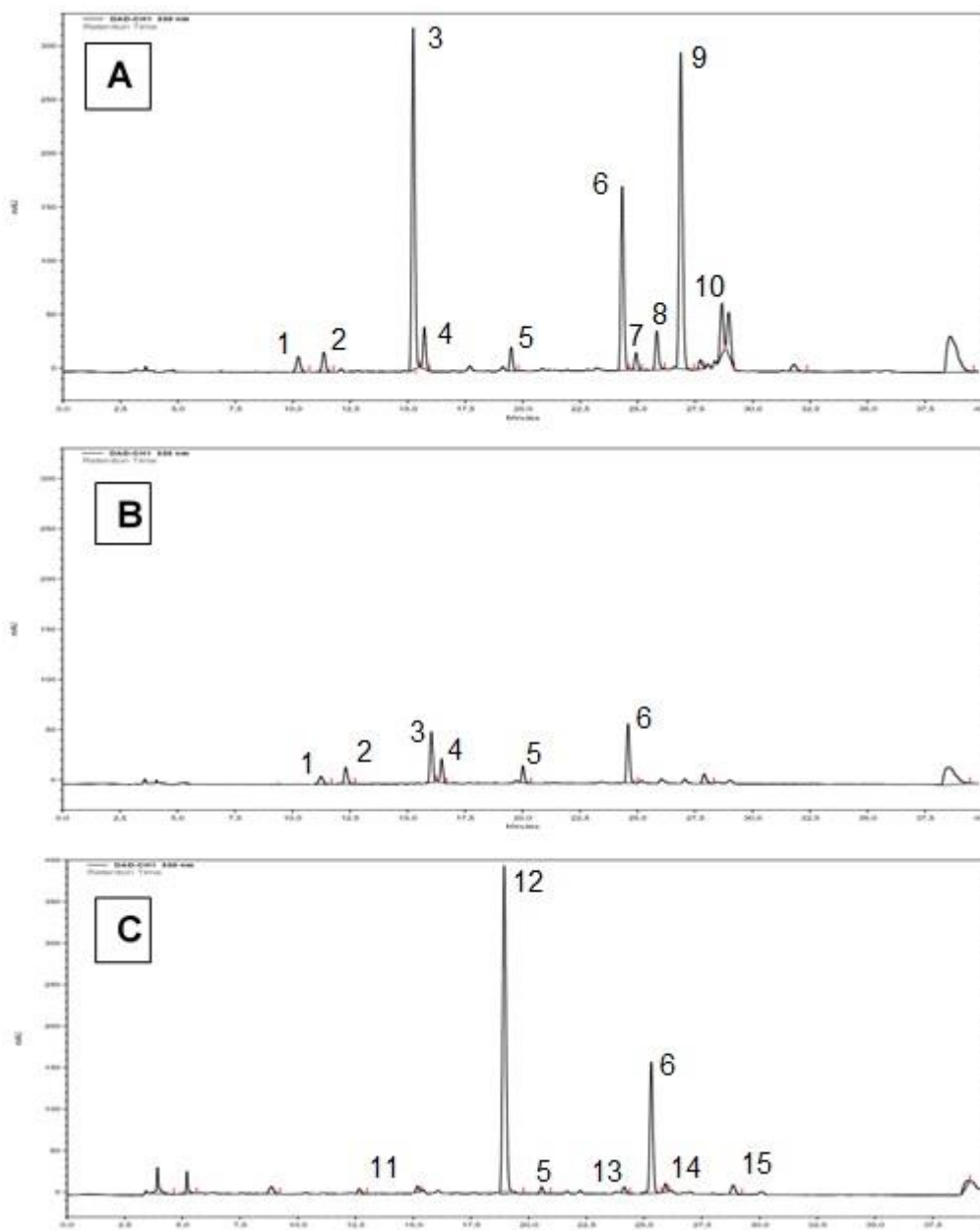


Figura 14 - Análise da seletividade do método para identificação e doseamento de marcadores do fitoterápico de *Cynara scolymus*. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da amostra sem indução de hidrólise (A), com indução de hidrólise ácida (B) e com indução de hidrólise básica (C). 2: ácido neoclorogênico; 3: ácido clorogênico; 4: ácido criptoclorogênico; 5: cinarina; 9: ácido isoclorogênico A; 10: ácido isoclorogênico C; 12: ácido cafeico; 1, 6, 7, 8, 13, 14 e 15: picos não identificados.

Após a indução de hidrólise ácida, os picos 7, 8, 9 (ácido isoclorogênico A) e 10 (ácido isoclorogênico C) foram degradados completamente e todos os outros picos foram degradados parcialmente. Os picos 1 e 6 apresentaram uma redução de área de 54,23% e 75,19%, respectivamente, enquanto os picos 2, 3 e 4, referentes ao ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico, apresentaram uma

redução de 20,21 %, 90,31% e 45,99%, respectivamente, sem apresentar coeluição com produtos de degradação resultantes da hidrólise ácida. Apesar do pico correspondente à cinarina (pico 5) ter apresentado um pequeno aumento na hidrólise ácida, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p > 0.05$, no teste t). Tais resultados demonstram a seletividade do método para a identificação destes marcadores.

Tabela 20 - Amostra sem indução de hidrólise na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.

Picos	Tempo de retenção	Área
1	10,63 ± 0,40	737856 ± 43599
2 (ac. neoclorogênico)	11,74 ± 0,41	832643 ± 39752
3 (ac. clorogênico)	15,60 ± 0,44	12065468 ± 669865
4 (ac. criptoclorogênico)	16,07 ± 0,44	1388076 ± 73427
5 (cinarina)	19,81 ± 0,46	823930 ± 33097
6	24,62 ± 0,51	6511089 ± 598960
7	25,22 ± 0,53	608555 ± 38066
8	26,13 ± 0,56	1520588 ± 119274
9 (ac. isoclorogênico A)	27,19 ± 0,61	12888146 ± 1059609
10 (ac. isoclorogênico C)	28,99 ± 0,71	1959496 ± 320170

Dados representam média ± desvio padrão

Tabela 21 – Amostra com indução de hidrólise ácida na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.

Picos	Tempo de retenção	Área
1	11,40 ± 1,05	337681 ± 154754
2 (ac. neoclorogênico)	12,50 ± 1,07	664335 ± 425718
3 (ac. clorogênico)	16,29 ± 1,13	1169416 ± 688896
4 (ac. criptoclorogênico)	16,75 ± 1,13	749734 ± 449164
5 (cinarina)	20,37 ± 1,13	979713 ± 479636
6	25,02 ± 1,48	1615169 ± 421660

Dados representam média ± desvio padrão

Com a indução da hidrólise básica, houve degradação completa dos picos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10. O pico 5, referente à cinarina, não coeluiu com outros produtos e teve uma redução de 66,25%, enquanto o pico 6 mostrou uma redução de 18,10%. Foram gerados cinco novos picos (11 a 15), sendo o pico 12 identificado como ácido cafeico, proveniente da degradação dos derivados cafeoilquínicos.

Tabela 22 – Amostra com indução de hidrólise básica na análise da seletividade do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos.

Picos	Tempo de retenção	Área
11	14,51 ± 1,18	284875 ± 27729
12 (ac. cafeico)	18,61 ± 1,25	15383203 ± 1692604
5 (cinarina)	20,27 ± 1,08	278025 ± 19478
13	23,71 ± 1,38	320663 ± 27431
6	24,99 ± 1,07	5332359 ± 629273
14	25,60 ± 1,08	410873 ± 71544
15	28,48 ± 1,20	514345 ± 33333

Dados representam média ± desvio padrão

e) Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados encontrados e o valor de referência assumido como verdadeiro (135). O método de adição de padrão foi o escolhido para a realização do teste. Neste método, quantidades conhecidas de padrão são adicionadas à amostra para a obtenção de concentrações teóricas finais baixa (80%), média (100%) e alta (120%).

A exatidão dos marcadores ácido clorogênico, criptoclorogênico, isoclorogênico A e C e cinarina, nas concentrações baixa, média e alta (Tabela 21), encontraram-se dentro da variação permitida de ± 15% em relação à concentração teórica final, demonstrando uma boa exatidão do método em relação a estes marcadores. Porém,

a exatidão do marcador ácido neoclorogênico, nas três concentrações, apresentou variação entre 17 e 19%.

Tabela 23 - Análise da exatidão do método para determinação do teor de derivados cafeoilquínicos

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	Exatidão (%)	Erro Padrão Relativo%
Ácido neoclorogênico			
5,38 (80%)	6,34 \pm 0,09	117,83	17,83
6,72 (100%)	8,05 \pm 0,03	119,00	19,00
8,06 (120%)	9,47 \pm 0,04	117,53	17,53
Ácido clorogênico			
33,12 (80%)	35,86 \pm 0,13	108,26	8,26
41,40 (100%)	46,33 \pm 0,04	111,90	11,90
49,69 (120%)	54,71 \pm 0,18	110,11	10,11
Ácido criptoclorogênico			
2,64 (80%)	2,62 \pm 0,07	99,08	0,92
3,30 (100%)	3,37 \pm 0,003	102,12	2,12
3,96 (120%)	4,02 \pm 0,002	101,53	1,53
Cinarina			
1,10 (80%)	1,23 \pm 0,005	111,82	11,82
1,37 (100%)	1,53 \pm 0,005	111,40	11,40
1,64 (120%)	1,77 \pm 0,004	108,08	8,08
Ácido isoclorogênico A			
17,77 (80%)	14,78 \pm 0,05	83,16	16,84
22,21 (100%)	19,10 \pm 0,02	86,00	14,00
26,66 (120%)	23,16 \pm 0,09	86,88	13,12
Ácido isoclorogênico B			
8,22 (80%)	7,98 \pm 0,01	97,11	2,89
10,28 (100%)	10,09 \pm 0,01	98,20	1,80
12,33 (120%)	11,90 \pm 0,01	96,55	3,45

5.5.1.2 Determinação do teor dos marcadores do fitoterápico de *Cynara scolymus*

Após validar o método, foi possível obter os perfis cromatográficos, identificar e quantificar os marcadores fitoquímicos dos fitoterápicos de *C. scolymus*. Em relação aos perfis cromatográficos, foi observada uma semelhança entre as marcas A e C, enquanto a marca B apresentou mais picos em relação às outras e, inclusive, foi a única que apresentou a cinarina entre seus compostos. O ácido cafeico não foi detectado em qualquer das amostras e todos os demais marcadores (ácidos neoclorogênico, clorogênico, criptoclorogênico e isoclorogênico A e C) estavam presentes nas três marcas (Figuras 15, 16 e 17).

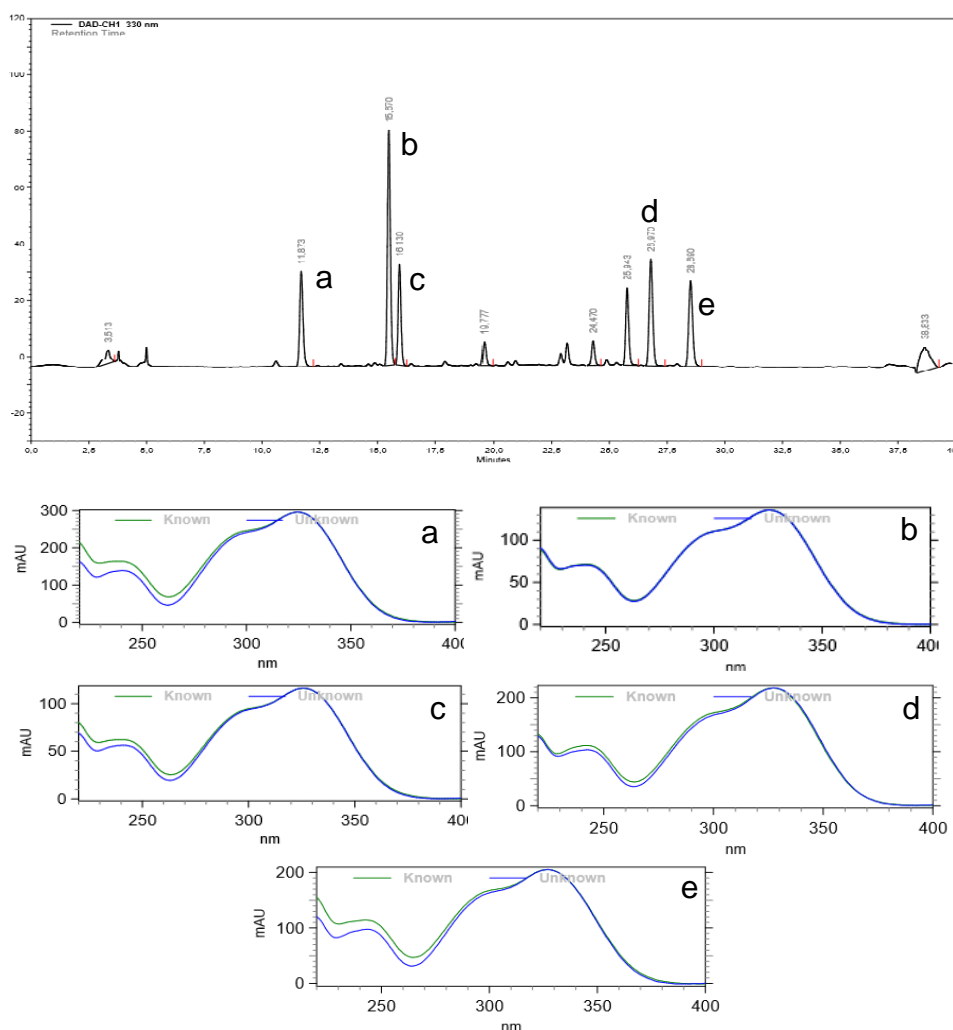


Figura 15 - Perfil cromatográfico e espectros da marca A de *Cynara scolymus*. Cromatograma e espectros dos marcadores sobrepostos aos espectros dos padrões obtidos por CLAE-DAD com detecção a 330 nm. a: Ácido neoclorogênico; b: ácido clorogênico; c: ácido criptoclorogênico; d: ácido isoclorogênico A; e: ácido isoclorogênico C.

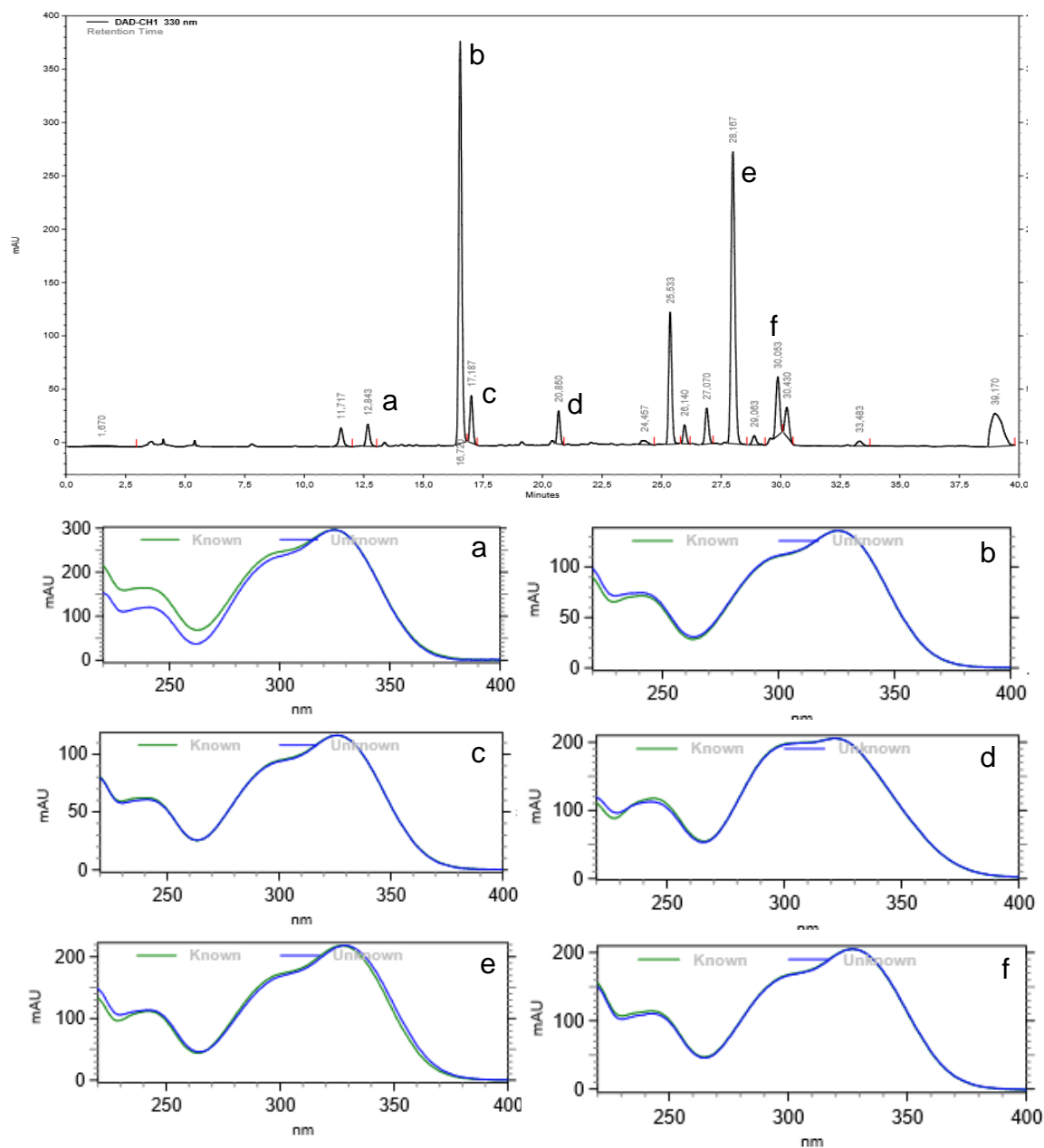


Figura 16 - Perfil cromatográfico e espectros da marca B de *Cynara scolymus*. Cromatograma e espectros dos marcadores sobrepostos aos espectros dos padrões obtidos por CLAE-DAD com detecção a 330 nm. a: Ácido neoclorogênico; b: ácido clorogênico; c: ácido criptoclorogênico; d: cinarina; e: ácido isoclorogênico A; f: ácido isoclorogênico C.

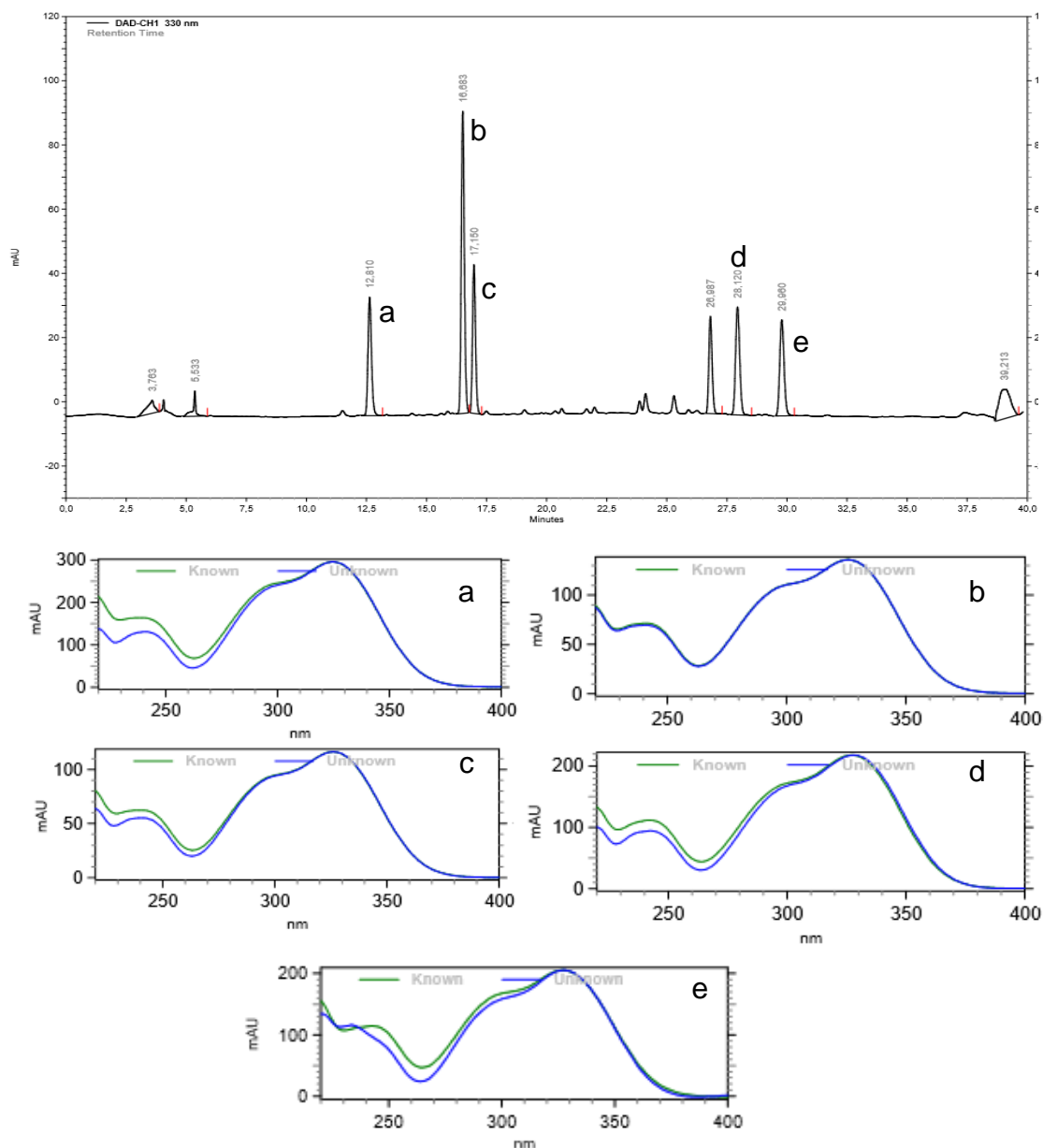


Figura 17 - Perfil cromatográfico e espectros da marca C de *Cynara scolymus*. Cromatograma e espectros dos marcadores sobrepostos aos espectros dos padrões obtidos por CLAE-DAD com detecção a 330 nm. a: Ácido neoclorogênico; b: ácido clorogênico; c: ácido criptoclorogênico; d: ácido isoclorogênico A; e: ácido isoclorogênico C.

A identificação de cada marcador foi realizada com base na semelhança entre os tempos de retenção e os espectros na região de UV, na amostra e no padrão. Os dados estão representados nas tabelas de 22 a 25.

Tabela 24 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca A de *Cynara scolymus*

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP	Similaridade com o padrão ± DP
ac. neoclorogênico	12,11 ± 0,73	1395545 ± 82960	0,9942 ± 0,0046
ac. clorogênico	15,90 ± 0,71	3024087 ± 151753	0,9999 ± 0,0002
ac. criptoclorogênico	16,35 ± 0,69	1252975 ± 56248	0,9971 ± 0,0033
ac. isoclorogênico A	27,13 ± 0,56	1635439 ± 51291	0,9976 ± 0,0031
ac. isoclorogênico C	28,85 ± 0,59	1441391 ± 51666	0,9932 ± 0,0072

Dados representam média das triplicatas ± desvio padrão obtidos na análise por CLAE-DAD

Tabela 25 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca B de *Cynara scolymus*

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP	Similaridade com o padrão ± DP
ac. neoclorogênico	12,49 ± 0,64	830469 ± 76514,96	0,9886 ± 0,0064
ac. clorogênico	16,40 ± 0,58	13098774 ± 1201150	0,9997 ± 0,0001
ac. criptoclorogênico	16,87 ± 0,56	1448755 ± 123638	0,9995 ± 0,0005
cinarina	20,60 ± 0,46	1040262 ± 51606	0,9989 ± 0,0010
ac. isoclorogênico A	27,96 ± 0,37	12003053 ± 957087	0,9989 ± 0,0001
ac. isoclorogênico C	29,83 ± 0,40	2365192 ± 215440	0,9994 ± 0,0005

Dados representam média das triplicatas ± desvio padrão obtidos na análise por CLAE-DAD

Tabela 26 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca C de *Cynara scolymus*

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP	Similaridade com o padrão ± DP
ac. neoclorogênico	12,79 ± 0,06	1493233 ± 39132	0,9916 ± 0,0025
ac. clorogênico	16,66 ± 0,06	3340822 ± 100243	0,9999 ± 0,0001
ac. criptoclorogênico	17,13 ± 0,06	1600487 ± 42782	0,9974 ± 0,0010
ac. isoclorogênico A	28,10 ± 0,06	1595081 ± 62475	0,9947 ± 0,0025
ac. isoclorogênico C	29,95 ± 0,07	1491633 ± 36429	0,9928 ± 0,0035

Dados representam média das triplicatas ± desvio padrão obtidos na análise por CLAE-DAD

Tabela 27 - Tempo de retenção e área dos padrões de *Cynara scolymus* a 25 µg/mL

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP
ac. neoclorogênico	12,43 ± 0,17	4610464 ± 274161
ac. clorogênico	16,01 ± 0,25	5016560 ± 193989
ac. criptoclorogênico	16,38 ± 0,56	6815625 ± 588445
Cinarina	21,11 ± 0,54	9049340 ± 525431
ac. isoclorogênico A	28,27 ± 0,07	12999208 ± 641521
ac. isoclorogênico C	29,32 ± 0,43	8635810 ± 460761

Dados representam média das triplicatas ± desvio padrão obtidos na análise por CLAE-DAD

Em relação ao teor, os cálculos foram realizados de duas maneiras. Foi calculado o teor de cada marcador utilizando as respectivas equações da reta obtidas por meio das curvas de linearidade (Tabela 26). E, para permitir as devidas comparações com os requisitos estabelecidos pela Anvisa, o teor dos marcadores também foi expresso em ácido clorogênico, utilizando a equação da reta do padrão de ácido clorogênico (Tabela 27).

Tabela 28 - Teor dos marcadores de *Cynara scolymus* determinado por CLAE-DAD

Marcadores	Concentração (mg/comprimido ou cápsula) ± DP		
	Marca A	Marca B	Marca C
ac. neoclorogênico	0,391 ± 0,022	0,408 ± 0,033	0,624 ^a ± 0,015
ac. clorogênico	0,746 ± 0,037	5,386 ^b ± 0,493	1,235 ± 0,037
ac. criptoclorogênico	0,231 ^c ± 0,010	0,448 ± 0,039	0,444 ± 0,012
cinarina	-	0,220 ± 0,012	-
ac. isoclorogênico A	0,160 ± 0,005	1,949 ^b ± 0,155	0,234 ± 0,009
ac. isoclorogênico C	0,202 ^c ± 0,008	0,564 ^d ± 0,052	0,315 ± 0,008
Total	1,73 (0,86%)	8,96 (2,67%)	2,85 (0,95%)

Análise de variância de uma via seguida do teste de tukey: ^a $p < 0,0001$ em relação as marcas A e B; ^b $p < 0,0001$ em relação as marcas A e C; ^c $p < 0,0001$ em relação as marcas B e C; ^d $p < 0,0001$ em relação a marca C.

Tabela 29 - Teor dos marcadores de *Cynara scolymus* expressos em ácido clorogênico determinado por CLAE-DAD

Marcadores	Concentração (mg/ comprimido ou cápsula) ± DP		
	Marca A	Marca B	Marca C
ac. neoclorogênico	0,346 ± 0,020	0,348 ± 0,031	0,556 ^a ± 0,014
ac. clorogênico	0,746 ± 0,037	5,386 ^b ± 0,493	1,235 ^c ± 0,037
ac. criptoclorogênico	0,311 ^d ± 0,014	0,602 ± 0,051	0,595 ± 0,016
cinarina	-	0,434 ± 0,021	-
ac. isoclorogênico A	0,405 ± 0,013	4,936 ^b ± 0,393	0,593 ^c ± 0,023
ac. isoclorogênico C	0,358 ± 0,013	0,978 ^b ± 0,088	0,555 ^c ± 0,013
Total	2,17 (1,08 %)	12,68 (3,78 %)	3,53 (1,17 %)
Total de derivados declarado na bula	1,40 (0,7 %)	7,00 (2,1 %)	1,5 de cinarina

Dados representados pela média ± desvio padrão (DP). Análise de variância de uma via seguida do teste de tukey. a: $p < 0,05$ em relação as marcas A e B; b: $p < 0,005$ em relação as marcas A e C; c: $p < 0,005$ em relação a marca A; d: $p < 0,05$ em relação as marcas B e C.

As amostras das diferentes marcas diferiram na quantidade de extrato por comprimido/cápsula (200, 335 e 300 mg, respectivamente) e no teor dos marcadores. Além de apresentar o perfil cromatográfico diferente das outras marcas, a marca B também foi a que mais apresentou diferenças no teor de seus marcadores em relação às outras, com concentrações significativamente maiores de ácido clorogênico e ácido isoclorogênico A e C. A marca B também apresentou a maior concentração total de derivados cafeoilquínicos por comprimido (8,96 mg/comprimido), seguida da marca C (2,85 mg/cápsula) e A (1,73 mg/comprimido) (Tabela 26).

Um estudo realizado em 2006 na Alemanha, também avaliou a quantidade de ácidos cafeoilquínicos em amostras comerciais contendo o extrato das folhas de alcachofra, no qual foi encontrado quantidades maiores de derivados cafeoilquínicos totais (6,56 a 11,87 mg/cápsulas) em relação ao encontrado no presente estudo (153). Outros estudos, entretanto, mostraram a eficácia do extrato das folhas e revelaram a presença de 1,5 % e 2,4 % de derivados cafeoilquínicos (57,154), mais próximo ao encontrado neste estudo.

Variações encontradas na quantidade de derivados cafeoilquínicos presentes na espécie *C. scolymus* podem ocorrer devido a diversos fatores como as diferenças no processo extrativo, variações climáticas, época de coleta e armazenamento (38,40,59). Assim, a padronização da obtenção dos extratos poderia contribuir para a manutenção da sua composição química e qualidade. Nesse sentido, a Anvisa disponibiliza o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, no qual são fornecidos modos de obtenção de extratos vegetais. A alcachofra, encontra-se entre as plantas contempladas no Formulário (100).

Apesar das informações sobre o processo extrativo serem necessárias para o registro dos medicamentos junto à Anvisa, não são comumente acessíveis à população. Uma maior transparência, por meio da inserção dessas informações na bula profissional do medicamento fitoterápico poderia fortalecer a confiança nesses produtos, favorecendo sua utilização.

Em relação aos requisitos de conteúdo dos marcadores, estabelecidos pela Anvisa, os marcadores ativos podem variar 15% em relação à quantidade declarada no rótulo (19). De acordo com os rótulos dos produtos A e B, a quantidade de derivados cafeoilquínicos expressos como ácido clorogênico em cada comprimido é equivalente a 1,4 mg e 7 mg, respectivamente. Porém, as marcas A e B apresentaram uma variação de +55% e + 81,14%, respectivamente, em relação à quantidade declarada. Diferente das outras, a marca C foi padronizada em 1,5 mg de cinarina por cápsula, entretanto, não houve quantidade detectável de cinarina nessa amostra.

De acordo com o recomendado pela Anvisa, a dose diária de derivados cafeoilquínicos expressos em ácido clorogênico deve ser entre 24 a 48 mg/dia. Levando em consideração a posologia de 6 comprimidos/ cápsulas por dia, sugerida nas bulas dos produtos, os produtos estão em desacordo com o estabelecido pela regulação (13,02; 76,08 e 21,18 mg, respectivamente), nas condições deste estudo. Tais resultados mostram uma variabilidade considerável entre os produtos e uma clara não-conformidade com a regulação sanitária Brasileira. Além disso, podem representar um impacto negativo significativo nos resultados terapêuticos.

Com relação ao método, em abril de 2016 a Anvisa disponibilizou para consulta pública (CP 163/2016) propostas de monografias de plantas medicinais da Farmacopeia Brasileira, na qual estava inserida uma proposta de monografia para as

folhas de *C. scolymus* (155). Essa monografia propõe um método de identificação e quantificação de marcadores por CLAE-DAD com foco nos marcadores ácido clorogênico, ácido cafeico e cinarina (155). Porém, deve ser ressaltado que no presente trabalho, não foi detectado ácido cafeico em qualquer das amostras. Além disso, a cinarina foi detectada apenas em uma das três amostras.

Apesar da literatura frequentemente associar os efeitos terapêuticos das folhas de *C. scolymus* com a cinarina, ressaltando-a como composto principal da planta, tais estudos ocorreram em outros países (156–159). Estudos anteriores, realizados com as folhas de alcachofra cultivadas no Brasil, relataram apenas traços de cinarina na planta (160,161). Além disso, a alta instabilidade química da cinarina dificulta a sua detecção no produto final (162,163). Porém, ainda é necessária a realização de mais estudos com plantas cultivadas no Brasil com a finalidade de elucidar a presença da cinarina e as implicações terapêuticas da sua ausência.

5.5.1.3 Identificação de compostos majoritários dos fitoterápicos de *Cynara scolymus* por CCD

O perfil cromatográfico das amostras de *C. scolymus* apresentaram duas bandas: uma banda azul-esverdeada de Rf 0,49, correspondente a banda do padrão de ácido clorogênico, e uma banda amarelo-alaranjado de Rf 0,74, sugestivo da presença de luteolina-7-glucosídeo, conforme descrito na EP 7^a ed. (Figura 18) (44).

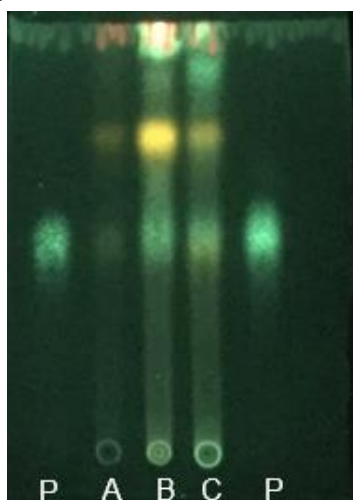


Figura 18 - Perfil cromatográfico das amostras de *Cynara scolymus* por cromatografia em camada delgada. P: padrão de ácido clorogênico; A: amostra; B: amostra B; C: amostra C

De acordo com a literatura, a luteolina-7-glucosídeo é o principal flavonoide encontrado nas folhas de *C. scolymus*. Além disso, alguns estudos associam a sua presença com a ação terapêutica da planta (61–63). Dessa forma, é essencial atestar a presença deste composto nas amostras, inclusive é um dos requisitos exigidos pela EP 7ª ed., na análise por CCD.

5.5.2 *Rhamnus purshiana*

5.5.2.1 Identificação e quantificação por espectrofotometria e CLAE-DAD

A FB 4ª ed., EP 7ª ed. e USP 30 NF 25, contêm métodos de controle da qualidade para a espécie vegetal *R. purshiana*. Os métodos consistem na quantificação de cascarosídeos por espectrofotometria, sendo precedida por um processo de extração líquido-líquido. As diferenças entre os métodos são pequenas, consistindo principalmente em mudanças no solvente utilizado. O método da EP 7ª ed. também foi apresentado recentemente na consulta pública (CP 163/2016) de propostas de monografias da Anvisa (155).

Apesar de existir método por CLAE-DAD na literatura (137), ele não é adotado para o controle da qualidade, pois o marcador da espécie, o cascarosídeo, não está disponível para comercialização. Então, primeiramente, optamos por utilizar o método presente na EP 7ª ed. (44).

Na primeira etapa do método, é realizada uma extração com solvente apolar para a remoção de agliconas livres. Após esta etapa, a amostra é submetida a um longo processo de aquecimento, com ácido clorídrico e cloreto férrico, para que os heterosídeos presentes no medicamento (no caso, os cascarosídeos) sejam hidrolisados e oxidados. Dessa forma, os heterosídeos são convertidos em antraquinonas livres e recuperados por meio da extração com solvente apolar (44,164).

Ao final do processo, o resíduo é dissolvido em uma solução metanólica de acetato de magnésio, que reage com os compostos restantes formando uma

coloração avermelhada. Essa solução é submetida à leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 515 e 440 nm. Quando a relação entre as absorvâncias obtidas é menor que 2,4, o ensaio é invalidado devido à passagem de agliconas para a fase aquosa durante a extração (44).

Nas análises realizadas neste estudo foram obtidas relações entre as absorvâncias menores que 2,4, portanto, foram invalidadas. Além disso, os resultados encontrados em cada análise não foram reproduzidos, apresentando claras diferenças entre eles (Tabela 28).

Tabela 30 - Absorvâncias obtidas no teste de quantificação de cascarosídeos por espectrofotometria

Análise	515 nm	440 nm	Razão 515/440
1	0,268	0,163	1,64
2	0,462	0,273	1,69
3	0,634	0,344	1,84
4	0,504	0,242	2,08

O método apresenta muitas etapas, exigindo em média 12 horas de dedicação integral para sua execução. Além disso, possibilita a ocorrência de mais interferências e erros analíticos. Dessa forma, há uma alta dependência da técnica do analista, o que dificulta a reprodutibilidade do método. Outra desvantagem é a utilização de grande quantidade de solventes orgânicos prejudiciais ao meio-ambiente e à saúde do analista.

Considerando a dificuldade de execução da técnica e os resultados obtidos no doseamento por espectrofotometria, foi feita a opção pelo desenvolvimento de uma análise por CLAE-DAD, mais rápida e com potencial de ser mais efetiva. Como o marcador cascarosídeo não é comercializado, foi utilizado, como substância de referência, o casantranol, que consiste em uma mistura de glicosídeos antraquinônicos isolados do extrato de *R. purshiana*.

O método utilizado foi apresentado no estudo de Gallo *et al.* (2013). Os perfis cromatográficos das amostras foram semelhantes entre si, ao perfil do casantranol e ao perfil apresentado na literatura. Os perfis apresentaram 2 picos majoritários com espectros na região UV similares.

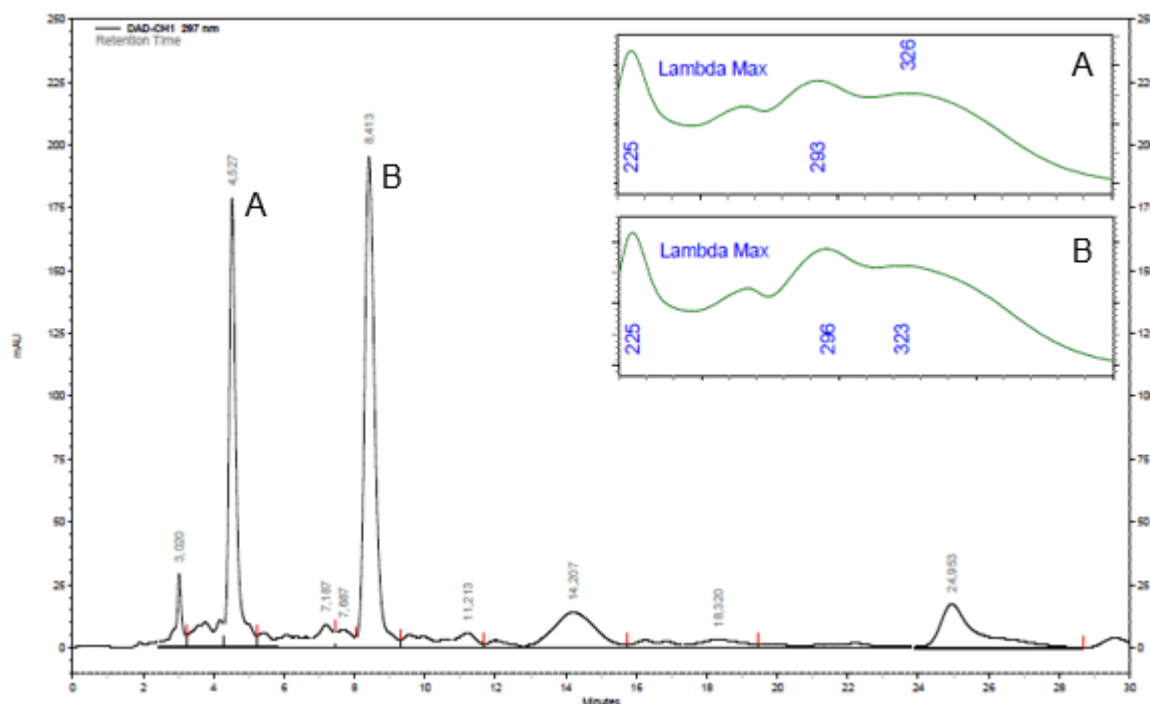


Figura 19 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote A de *Rhamnus purshiana* obtidos por CLAE-DAD com detecção a 297 nm.

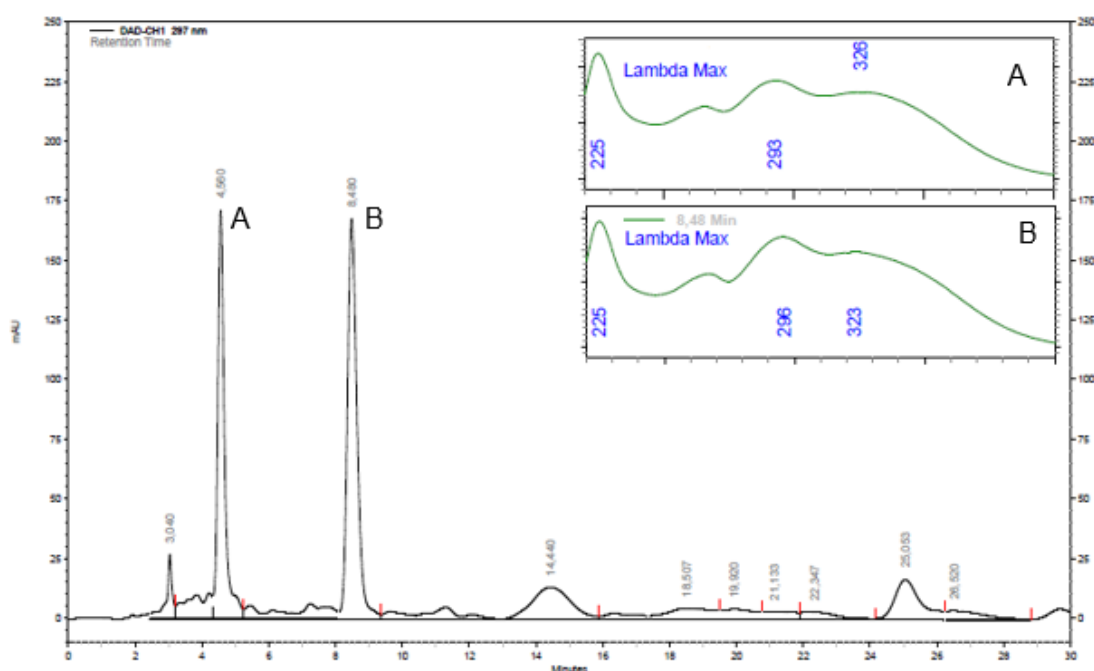


Figura 20 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote B de *Rhamnus purshiana* obtidos por CLAE-DAD com detecção a 297 nm.

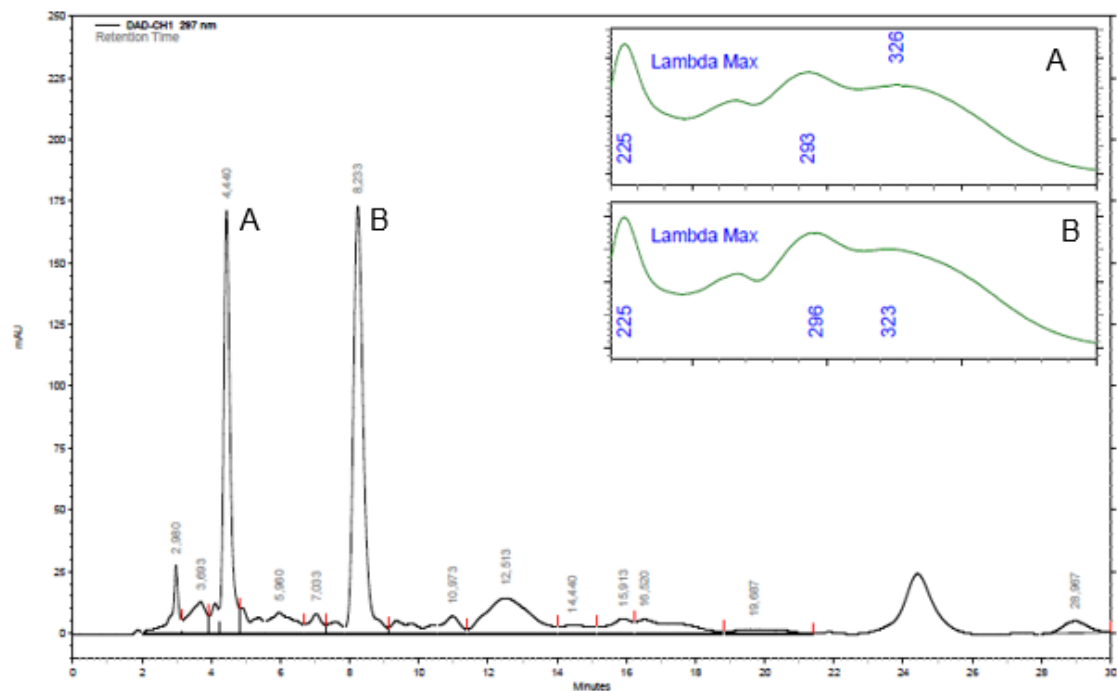


Figura 21 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV do lote C de *Rhamnus purshiana* obtidos por CLAE-DAD com detecção a 297 nm.

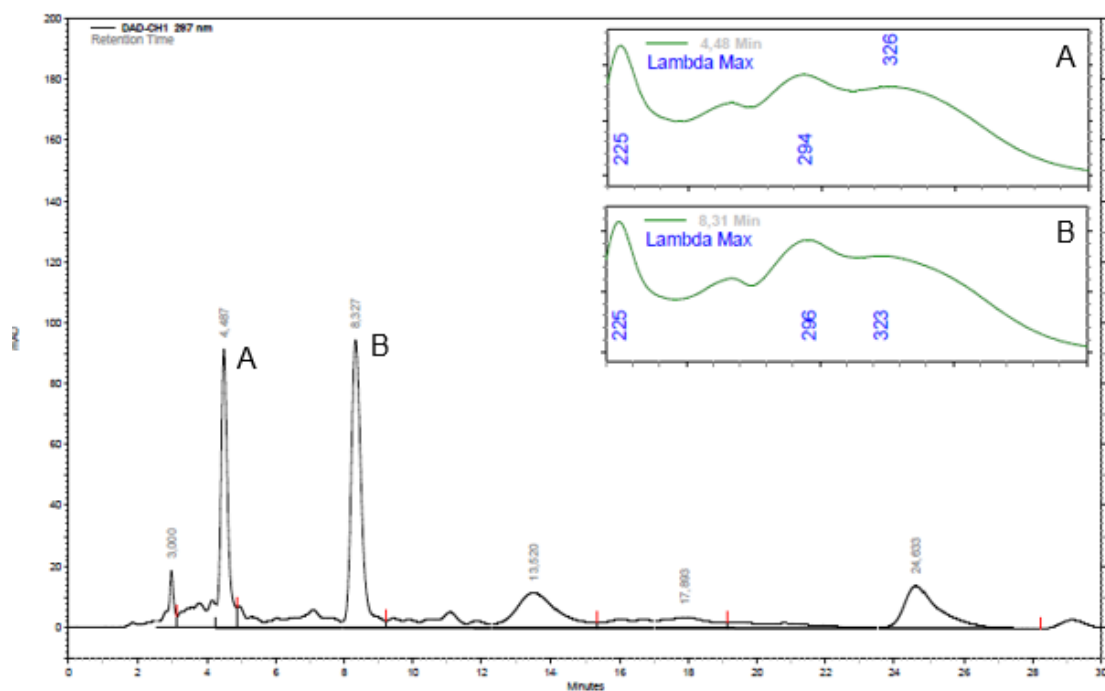


Figura 22 - Perfil cromatográfico e espectros na região UV da substância de referência, casantranol, obtidos por CLAE-DAD com detecção a 297 nm.

Foi calculada a relação, em porcentagem, entre a soma das áreas dos picos majoritários nas amostras e a soma das áreas dos picos majoritários na substância de referência, o casantranol. Como o casantranol foi preparado na concentração de 1 mg/mL, a soma das áreas dos picos nas amostras foi primeiramente dividida por dois antes de se estabelecer a relação, pois as amostras foram preparadas na concentração de 2 mg de extrato por mL.

Tabela 31 - Áreas dos picos majoritários das amostras de *R. purshiana*

	Soma das áreas dos picos majoritários A e B	Relação amostra/casantranol (%)
Lote A	25462684 ± 875709	101,17 %
Lote B	23487219 ± 387873	93,32 %
Lote C	22738521 ± 495271	90,34 %
Casantranol	12584107 ± 272530	-

As amostras dos lotes A, B e C apresentaram uma relação próxima com o casantranol, o que poderia sugerir que essas amostras estejam próximas a concentração do casantranol que é padronizado em 21% de derivados hidroxiantracênicos totais, dos quais 91% são cascarosídeos. A EP 7^a ed. e a FB 4^a ed. estabeleceram um mínimo de 8% de hidroxiantracênicos totais, dos quais, no mínimo, 60% devem ser cascarosídeos, calculados como cascarosídeo A. A bula dos medicamentos apresenta a quantidade de 16% de hidroxiantracênicos calculados como cascarosídeo A (44,73).

Para possibilitar a afirmação das concentrações dos marcadores ainda é necessária a identificação dos picos majoritários. Depois de apropriadamente identificados, o método necessitaria de uma revalidação, principalmente em termos de linearidade. Assim, a utilização deste método e da substância de referência, o casantranol, propiciaria uma análise mais eficaz do medicamento.

O estudo de Gallo *et al* (2013), que disponibilizou este método, realizou o isolamento do cascarosídeo por CCD preparativa e utilizou a substância isolada como

referência para realizar as análises por CLAE-DAD. Porém, a substância isolada não passou por qualquer método para confirmar a identidade do cascarosídeo.

Dessa forma, pretende-se, em estudos posteriores, realizar o isolamento do cascarosídeo a partir do casantranol e identificar apropriadamente o composto por meio de técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear. Espera-se que após a identificação seja possível quantificar o cascarosídeo nas amostras contendo o fitoterápico *R. purshiana*, e o método por CLAE-DAD possa ser utilizado no controle da qualidade da espécie, em substituição ao método espectrofotométrico.

5.5.2.2 Identificação de compostos majoritários por CCD

As amostras dos lotes A, B e C de *R. purshiana*, também foram submetidas a CCD para identificação de compostos majoritários. A CCD é um método fácil e barato que pode ser facilmente implementado em farmácias de manipulação para confirmação da identidade das plantas utilizadas na manipulação de medicamentos.

O perfil cromatográfico das amostras e do casantranol foram semelhantes entre si e ao perfil da planta apresentado por Wagner e Bladt (139). As bandas amarelas com brilho intenso, de Rf 0,12 sugerem a presença dos cascarosídeos A e B, enquanto as bandas amarelas de menor intensidade de Rf 0,22 sugerem a presença de cascarosídeos C e D. Também houve a formação de bandas de coloração azulada entre os fatores de retenção 0,37 – 0,5, e bandas amarelas de Rf 0,57 e 0,67, sugestivas da presença de aloína e desoxialoína, respectivamente (Figura 23) (139).

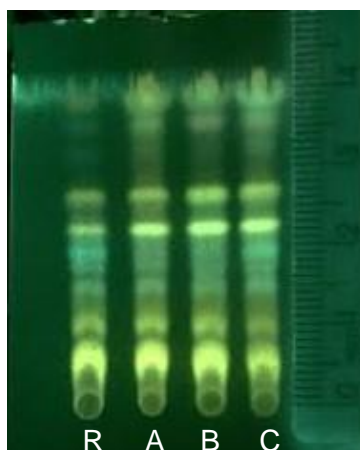


Figura 23 - Perfil cromatográfico por CCD das amostras de *Rhamnus purshiana*. R: substância de referência (casantranol); A: lote A; B: lote B; C: lote C.

5.5.3 *Mikania glomerata*

O método de identificação e quantificação por CLAE-DAD previamente validado no Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília, permitiu uma análise rápida, de apenas dez minutos para cada amostra, e eficaz das amostras. Levando em consideração que não há método de análise para a espécie *M. glomerata* na última edição da Farmacopeia Brasileira ou em outra farmacopeia estrangeira, este método poderia ser facilmente implementado.

Foram obtidos os perfis cromatográficos das marcas A, B e C (Figura 24) e foram identificados os picos referentes à cumarina, que mostraram tempo de retenção próximo ao tempo do pico do padrão de cumarina (Figura 25) e, também apresentaram similaridade maior que 0,99 com o espectro do padrão (Tabela 30).

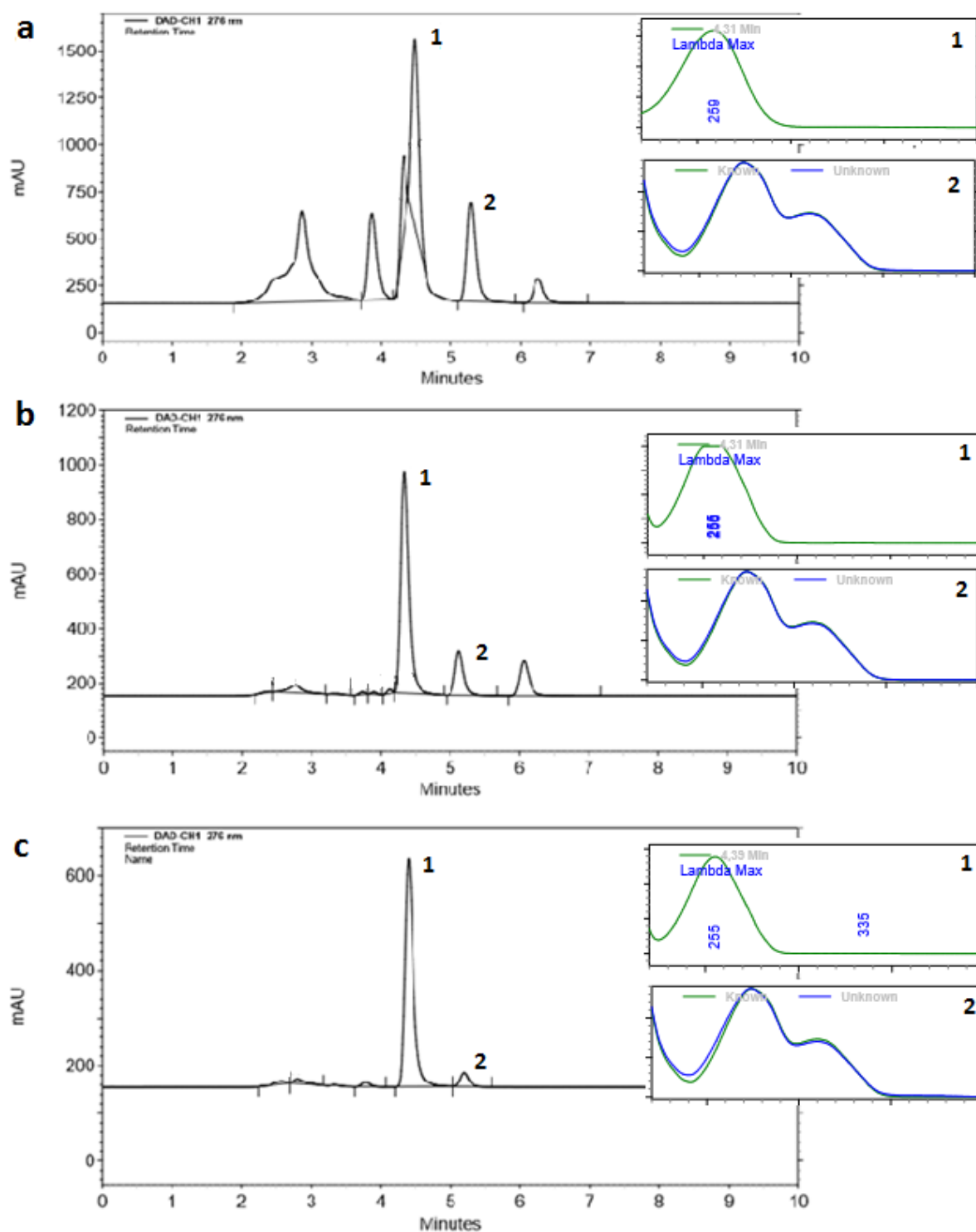


Figura 24 - Perfis cromatográficos e espectros das amostras de *Mikania glomerata*. Perfil cromatográfico e espectros obtidos por CLAE-DAD. 1: pico referente à substância desconhecida. 2: pico referente à cumarina. a: marca A; b: marca B; c: marca C.

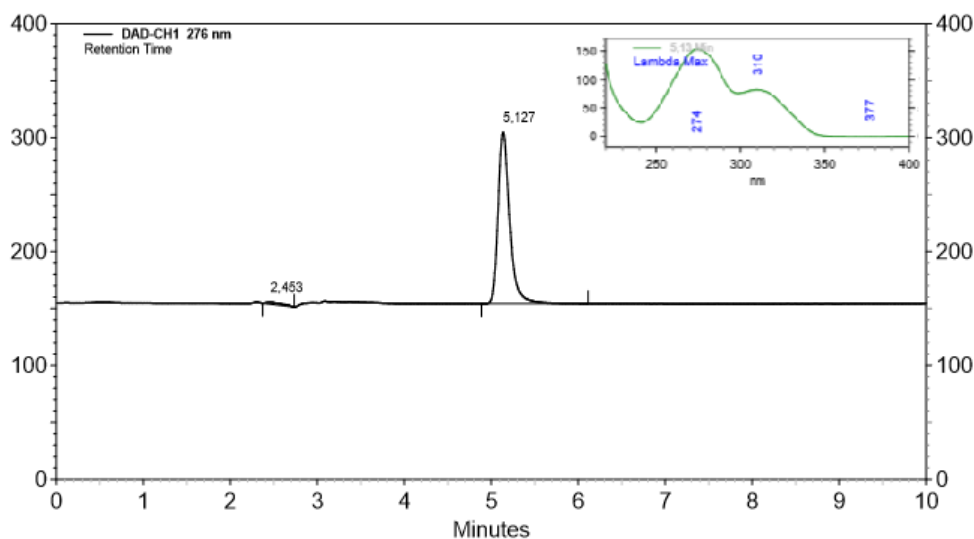


Figura 25 - Perfil cromatográfico do padrão de cumarina e seu espectro obtido por CLAE-DAD.

Tabela 32 - Tempo de retenção, área e similaridade dos picos referentes a cumarina nas amostras de *Mikania glomerata*.

	Tempo de retenção \pm DP	Áreas \pm DP	Similaridade com o padrão \pm DP
Marca A	5,25 \pm 0,03	18067358 \pm 1118943	0,9997 \pm 0,0002
Marca B	5,10 \pm 0,02	5411701 \pm 28958	0,9998 \pm 0,0000
Marca C	5,19 \pm 0,04	921952 \pm 85910	0,9988 \pm 0,0000
Cumarina	5,13 \pm 0,02	5604605 \pm 24281	-

A comparação da área do pico do padrão de cumarina com as áreas dos picos equivalentes nas amostras (mesmo tempo de retenção e espectro) permitiu a determinação do teor de cumarina nas amostras. As marcas A, B e C apresentaram variações de +6,67%, +17,07% e - 5,71%, respectivamente, em relação ao teor declarado (Tabela 31). De acordo com a IN 4/2014, no caso da cumarina, que é considerado como um marcador ativo da espécie, é permitido uma variação de \pm 15% (19). Portanto, a marca B foi a única a ultrapassar os limites de variação.

Tabela 33 - Teor de cumarina declarado no rótulo e determinado

	Teor de cumarina (mg/mL)	
	Declarado	Determinado
Marca A	0,30	0,322 ± 0,020
Marca B	0,082	0,097 ± 0,001
Marca C	0,035	0,033 ± 0,003
Padrão cumarina	-	0,02

Em relação à dose diária, a Anvisa estabeleceu na IN 2/2014 a variação de 0,5 a 5 mg de cumarina (99). Relacionando a posologia apresentada nas bulas das amostras e o teor determinado de cumarina, foram encontradas as doses diárias de 4,8 mg, 4,32 mg e 0,7 mg nas amostras da marca A, B e C, respectivamente. Desta forma, apesar da diferença observada entre as marcas A e B e a marca C, todas se apresentaram dentro dos limites de variação da dose diária estabelecida pela Anvisa.

Também vale relatar que foi observado, no perfil cromatográfico das três marcas, que a cumarina não foi o composto majoritário, mas sim um composto não identificado com tempo de retenção aproximado de quatro minutos e 35 segundos e espectro no UV com máxima de absorção em 255 nm.

Outros estudos reportam, além da cumarina, a presença, em quantidades significativas, de ácido o-cumárico e ácido caurenico, que também possuem efeitos terapêuticos relevantes. Dessa forma, acredita-se que os efeitos produzidos pelo guaco não podem ser atribuídos somente à cumarina (104,107,165,166). Porém, assim como ressaltado anteriormente nas análises dos fitoterápicos à base de *C. scolymus*, é necessária a realização de mais pesquisas com foco na descoberta de uma combinação de compostos efetivos que sejam representativos na análise do fitoterápico.

É perceptível que este é um desafio encontrado no controle da qualidade dos fitoterápicos em geral e não somente nos fitoterápicos relatados no presente trabalho. É necessário entendê-los como uma mistura complexa de constituintes fitoquímicos que agem de forma sinérgica no organismo humano. Nesse sentido, autores defendem a ideia da análise realizada com múltiplos marcadores, no lugar da análise centrada em apenas um marcador (41,167–169), que pode ocasionar a

descaracterização do extrato vegetal na busca pelo estrito atendimento à legislação sanitária.

5.5.4 *Uncaria tomentosa*

A espécie *U. tomentosa* não possui monografia para controle da qualidade na Farmacopeia Brasileira, portanto foi necessário buscar métodos de análise em outras farmacopeias oficiais reconhecidas pela Anvisa. O método da USP 39 por CLAE-DAD é focado em múltiplos marcadores, permitindo uma análise mais representativa da qualidade do medicamento.

O método foi facilmente reproduzido em nosso laboratório e permitiu a identificação e quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina) e a identificação dos alcaloides oxindólicos tetracíclicos (rincofilina e isorincofilina) presentes nos fitoterápicos à base de *U. tomentosa*. Os perfis cromatográficos das amostras comerciais foram semelhantes entre si e ao perfil do extrato padronizado de *U. tomentosa* da USP e seu certificado de análise (Figuras 26, 27 e 28).

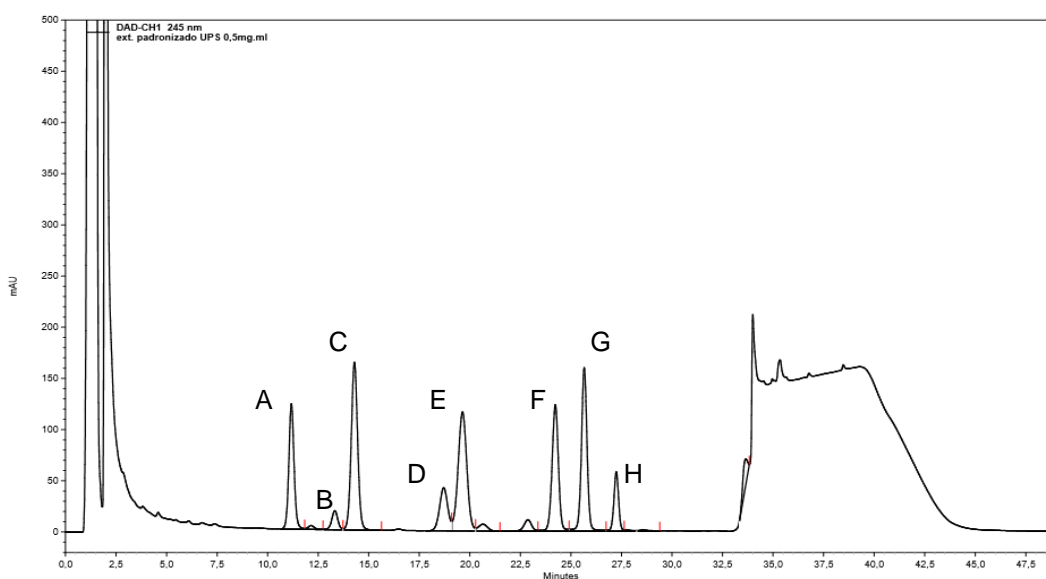


Figura 26 - Perfil cromatográfico do extrato padronizado de *Uncaria tomentosa* obtido por CLAE-DAD. A: especiofilina; B: uncarina F; C: mitrafilina; D: isomitrafilina; E: pteropodina; F: rincofilina; G: isorincofilina; H: isopteropodina

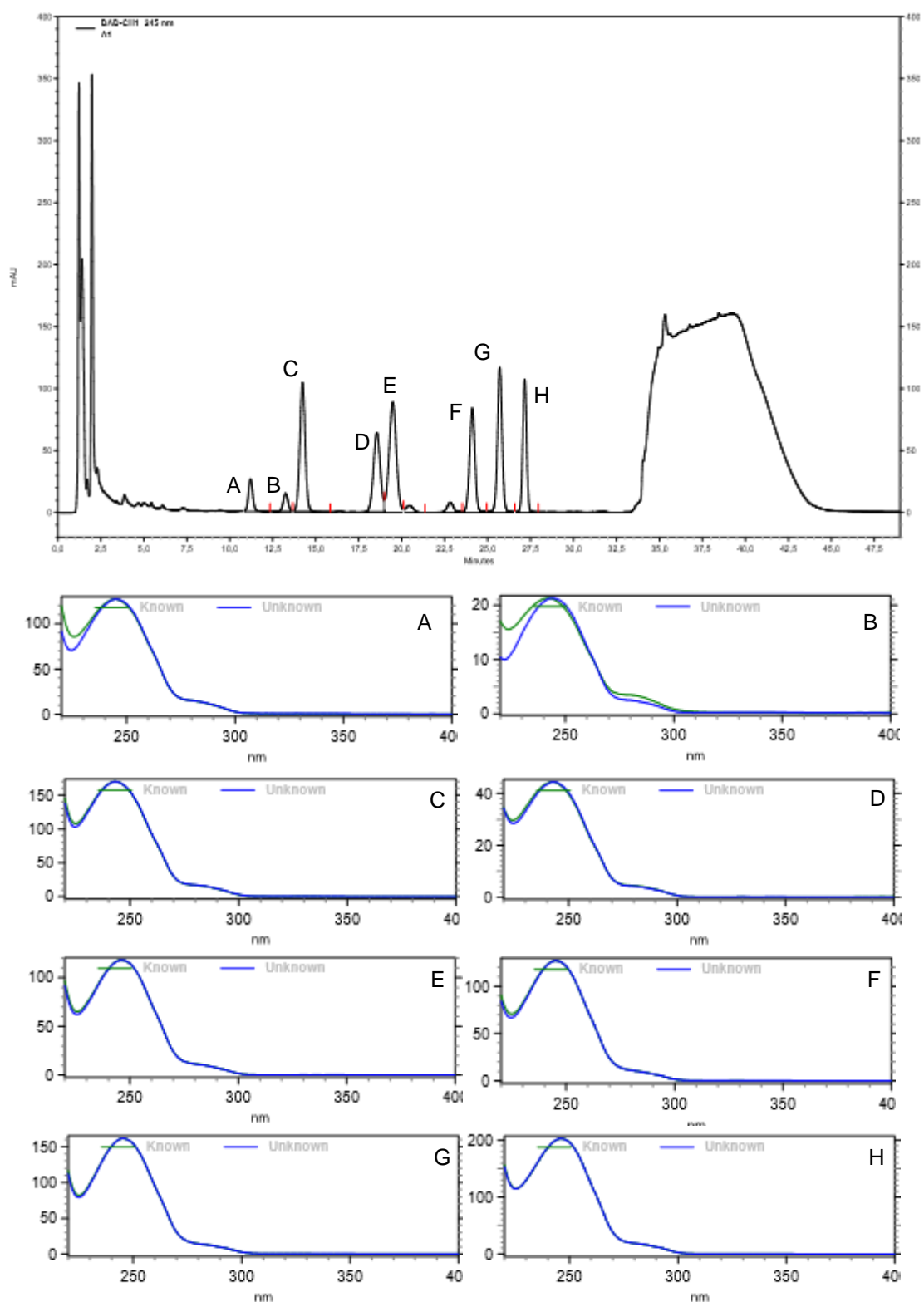


Figura 27 - Perfil cromatográfico do fitoterápico da marca A de *Uncaria tomentosa* obtido por CLAE-DAD. Espectros UV sobrepostos aos espectros dos picos correspondentes no extrato padronizado. A: especiofilina; B: uncarina F; C: mitrafilina; D: isomitrafilina; E: pteropodina; F: rincofilina; G: isorincofilina; H: isopteropodina.

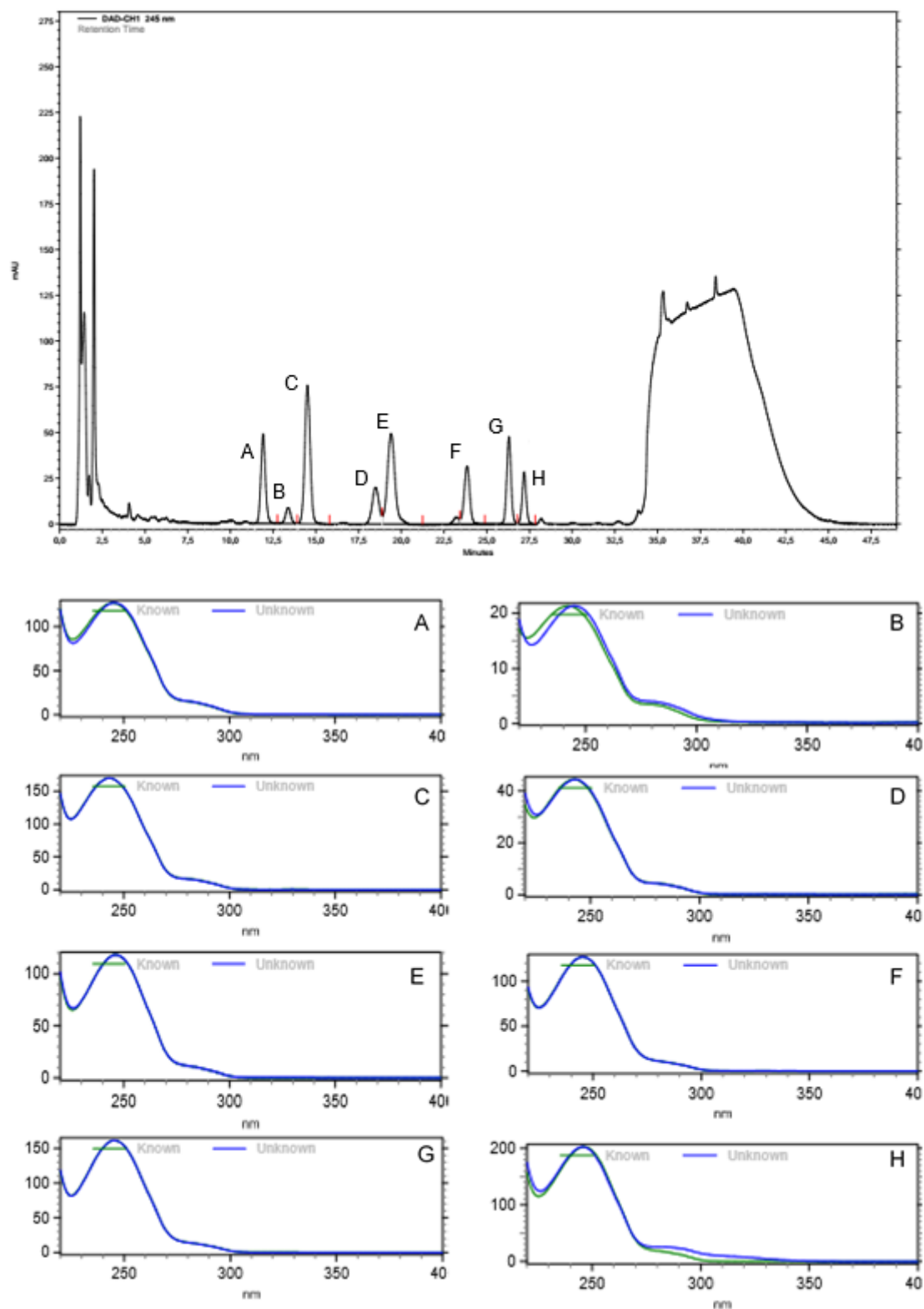


Figura 28 - Perfil cromatográfico do fitoterápico de *Uncaria tomentosa* da marca B obtido por CLAE-DAD. Espectros UV sobrepostos aos espectros dos picos correspondentes no extrato padronizado. A: especiofilina; B: uncarina F; C: mitrafilina; D: isomitrafilina; E: pteropodina; F: rincofilina; G: isorincofilina; H: isopteropodina.

Os compostos fitoquímicos nas amostras foram identificados a partir da comparação dos tempos de retenção e similaridade dos espectros dos picos na amostra com os picos respectivos no extrato padronizado (Tabelas 32 e 33).

Tabela 34 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca A de *Uncaria tomentosa*

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP	Similaridade com o padrão ± DP
Especiofilina	11,23 ± 0,02	1852952 ± 58474	0,9968 ± 0,0001
Uncarina F	13,25 ± 0,01	1192326 ± 32292	0,9896 ± 0,0002
Mitrafilina	14,24 ± 0,01	9047354 ± 170860	0,9998 ± 0,0000
Isomitrafalina	18,55 ± 0,01	7112343 ± 107875	0,9997 ± 0,0000
Pteropodina	19,47 ± 0,02	10419684 ± 189170	0,9998 ± 0,0000
Rincofilina	24,11 ± 0,02	7312452 ± 130412	0,9998 ± 0,0000
Isorincofilina	25,75 ± 0,04	8790587 ± 195769	0,9999 ± 0,0000
Isopteropodina	27,16 ± 0,01	6832741 ± 122477	1,0000 ± 0,0000

Tabela 35 - Tempo de retenção, área e similaridade dos marcadores da marca B de *Uncaria tomentosa*

Marcador	Tempo de retenção ± DP	Área ± DP	Similaridade com o padrão ± DP
Especiofilina	11,91 ± 0,01	3678974 ± 42628	0,9996 ± 0,0001
Uncarina F	13,39 ± 0,01	731458 ± 25162	0,9972 ± 0,0003
Mitrafilina	14,52 ± 0,02	6677682 ± 128874	1,0000 ± 0,0000
Isomitrafalina	18,51 ± 0,02	2214175 ± 46483	0,9995 ± 0,0000
Pteropodina	19,42 ± 0,02	6077845 ± 125245	0,9999 ± 0,0000
Rincofilina	23,86 ± 0,02	2865695 ± 81366	1,0000 ± 0,0000
Isorincofilina	26,28 ± 0,03	3404199 ± 55588	1,0000 ± 0,0000
Isopteropodina	27,19 ± 0,01	1884732 ± 57121	0,9971 ± 0,0001

Comparando as áreas dos picos nas amostras com a área do pico do padrão de isopteropodina, de concentração conhecida, foi obtida a concentração dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) expressos como isopteropodina. Os produtos da marca A e B apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) no teor total de AOP e no teor de cada marcador no teste *t-student*. Porém, apesar de serem diferentes entre si, tanto o produto da marca A, como o da marca B mostraram um percentual maior do que o mínimo de 0,3%, estabelecido pela USP (Tabela 34).

Tabela 36 - Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas amostras de *Uncaria tomentosa*

Marcadores	Concentração (mg/comprimido ou cápsula) \pm DP	
	Marca A	Marca B
Especiofilina	0,120 \pm 0,004	0,095 \pm 0,001
Uncarina F	0,077 \pm 0,002	0,019 \pm 0,001
Mitrafilina	0,585 \pm 0,011	0,173 \pm 0,003
Isomitrafilina	0,460 \pm 0,007	0,057 \pm 0,001
Pteropodina	0,674 \pm 0,012	0,157 \pm 0,003
Isopteropodina	0,442 \pm 0,008	0,049 \pm 0,001
Total	2,36 (2,36%)	0,55 (0,55%)

Estes resultados são semelhantes aos encontrados em estudo anterior, que avaliou a concentração de AOP totais em amostras do córtex da raiz de *U. tomentosa* retiradas da natureza e amostras comerciais, nas quais foram encontradas variações de 0,057 a 2,584 % e 0,528 a 1,043%, respectivamente (122).

Também foi calculada a porcentagem de alcaloides oxindólicos tetracíclicos (AOT) em relação ao total de pentacíclicos, comparando as áreas totais dos compostos. Apesar de apresentarem o teor mínimo de AOP, os produtos das marcas A e B mostraram 44,17% e 29,48% de AOT em relação ao total de AOP, que é maior do que o máximo de 25% estabelecido pela USP.

O requisito estabelecido pela USP deve-se à existência de dois quimiotipos de *U. tomentosa*: um enriquecido com alcaloides oxindólicos pentacíclicos e outro enriquecido com alcaloides oxindólicos tetracíclicos (121,122). Alguns autores sugeriram um efeito antagonista dos AOT em relação aos efeitos benéficos causados pelos AOP (128,129). Além disso, a atividade da espécie vegetal vem sendo mais associada aos alcaloides pentacíclicos (123–125), inclusive foi realizado um estudo clínico que sugeriu a segurança e eficácia do extrato livre de AOT (111).

Portanto, os altos valores da relação AOT/AOP encontrados neste trabalho poderiam representar um risco ou falha na eficácia do medicamento. Porém, não se pode afirmar com certeza, pois ainda são necessários mais estudos para a confirmação dos mecanismos de ação e os compostos fitoquímicos associados.

Não foi possível estabelecer as comparações necessárias com os requisitos definidos pela Anvisa e com os rótulos dos medicamentos, pois estes foram padronizados em total de alcaloides (incluindo AOP e AOT) calculados como mitrafilina, enquanto neste trabalho os resultados foram expressos em isopteropodina. Apesar disso, as comparações realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos pela USP possibilitaram a análise da qualidade dos medicamentos.

6 CONCLUSÃO

O monitoramento da qualidade de medicamentos consiste em uma ação de vigilância sanitária fundamental para a proteção da saúde individual e coletiva. Além disso, esta ação está prevista na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Contudo, poucos estudos propõem a avaliação da qualidade de fitoterápicos comercializados no Brasil. Neste estudo, medicamentos fitoterápicos de quatro espécies vegetais, presentes na RENAME 2014, foram avaliados quanto à qualidade. E, apesar de não ser objetivo do trabalho, ao avaliar a qualidade dos medicamentos também foi possível discutir a adequabilidade dos métodos utilizados.

Na análise de rótulos e bulas foi observado um maior desvio da qualidade nas bulas do medicamento. Apenas 33,33% das bulas apresentaram todas as informações requeridas de maneira correta, enquanto, nas análises de parâmetros gerais como peso médio, volume, viscosidade, pH, desintegração e friabilidade, foram observados poucos desvios na qualidade dos medicamentos.

Foi verificado que nenhuma das espécies avaliadas neste estudo possui monografia específica na versão atual da Farmacopeia Brasileira. Apesar das espécies *C. scolymus*, *M. glomerata* e *R. purshiana* terem sido apresentadas em versões anteriores, as monografias estão desatualizadas, não sendo condizentes com os avanços científicos. Portanto, foram utilizados métodos apresentados por outras farmacopeias oficiais e pela literatura científica.

Foi realizada a revalidação do método de análise dos extratos de *C. scolymus* presente na Farmacopeia Europeia. Além do ácido clorogênico, os derivados cafeoilquínicos ácido neoclorogênico, criptoclorogênico, isoclorogênico A e C e a cinarina foram incluídos como marcadores, possibilitando uma análise mais representativa da qualidade dos medicamentos. Foi observada em duas amostras, a ausência da cinarina, um composto relatado como um dos principais da espécie *C. scolymus*. Além disso, foram observados desvios significativos no teor dos marcadores, representando um potencial risco para a saúde.

A avaliação dos fitoterápicos de *R. purshiana* foi um desafio. O método espectrofotométrico disponível em compêndios oficiais apresentou baixa

reprodutibilidade neste estudo. Foi feita a opção pela utilização de um método, apresentado na literatura, por CLAE-DAD e a amostra foi comparada com o casantranol, uma mistura de glicosídeos antracênicos isolados da espécie. Porém, a falta do marcador (casarosídeo) no comércio impossibilitou a quantificação do mesmo nas amostras.

O método por CLAE-DAD, previamente validado em nosso laboratório, provou ser rápido e efetivo para avaliação da presença de cumarina em medicamentos fitoterápicos contendo *M. glomerata*. A cumarina não foi o composto majoritário nas amostras, porém estava em quantidade adequada para a ingestão diária, conforme recomendado pela Anvisa.

Os fitoterápicos de *U. tomentosa* foram avaliados em relação ao conteúdo de alcaloides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos por meio do método da Farmacopeia dos Estados Unidos. Apesar de apresentarem a quantidade mínima requerida de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, os fitoterápicos apresentaram uma alta relação de alcaloides oxindólicos tetracíclicos, o que pode alterar a eficácia dos medicamentos.

Por fim, a maioria dos medicamentos testados apresentou não conformidade com os parâmetros de qualidade estabelecidos pelas farmacopeias, em pelo menos um teste, nas condições desse estudo (Quadro 1).

Quadro 1 - Resumo dos resultados da avaliação da qualidade dos medicamentos

		Registro	Rótulo EP	Rótulo ES	Bula	PM/ Volume	Desintegração	Teor	Dose diária
<i>C. scolymus</i>	A	X	✓	X	X	✓	✓	X	X
	B	✓	✓	✓	X	✓	✓	X	X
	C	✓	X	X	X	✓	✓	X	X
<i>R. purshiana</i>	A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NA	NA
	B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NA	NA
	C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NA	NA
<i>M. glomerata</i>	A	✓	✓	✓	✓	X	NA	✓	✓
	B	✓	✓	X	X	✓	NA	X	✓
	C	✓	✓	X	X	✓	NA	✓	✓
<i>U. tomentosa</i>	A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	NA
	B	✓	X	X	X	X	✓	X	NA

* EP: Embalagem primária; ES: Embalagem secundária; PM: peso médio; X: não conforme; ✓ : conforme; NA: não avaliado

7 PERSPECTIVAS

É esperado que este trabalho possa nortear a realização de mais estudos no sentido de confirmar ou estabelecer conjuntos de marcadores ativos das espécies, possibilitando uma avaliação mais representativa da qualidade dos fitoterápicos. É necessário que as metodologias utilizadas sejam frequentemente avaliadas e readaptadas para acompanhar os avanços científicos e tecnológicos. Dessa forma, o monitoramento da qualidade torna-se mais efetivo e fornece uma real contribuição para a proteção da saúde humana.

A inclusão, na Farmacopeia Brasileira, de monografias das espécies presentes na RENAME, também é essencial. As monografias podem fornecer uma maior padronização da avaliação realizada pelas próprias indústrias farmacêuticas e, como consequência, uma maior padronização dos produtos.

Em relação à espécie *M. glomerata*, há a necessidade de verificar qual é o marcador majoritário e avaliar qual é sua relação com o efeito terapêutico. Assim, poderá ser acrescentado mais um marcador na análise da espécie. Em relação à espécie *R. purshiana* seu marcador é bem estabelecido, mas sua ausência no mercado dificulta a análise. Dessa maneira, há necessidade de investigação de uma melhor forma de avaliação, sendo o casantranol um potencial marcador para ser utilizado como referência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robinson MM, Zhang X. the World Medicines Situation 2011 Traditional Medicines: Global Situation , Issues and Challenges. World Heal Organ. 2011;(3rd Edition):1–14.
2. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 [Internet]. World Health Organization. 2013. p. 1–78. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/92455>
3. Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 2006;71.
4. Figueredo C, Gurgel IGD, Gurgel Junior GD. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. Physis. 2014;24(2):381–400.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. Brasília Ministério da Saúde. 2006;
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Diário Oficial da União. 2007;
7. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.982 de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. Diário Oficial da União. 2009;
8. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME 2014. 9ª. Ministério da Saúde. Brasília, DF; 2015.
9. Ministério da Saúde. Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS [Internet]. 2016. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>
10. Brasil. Decreto nº 19.606, de 19 de janeiro de 1931. Dispõe sobre a profissão

- farmacêutica e seu exercício no Brasil. Diário Oficial da União. 1931;
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. Diário Oficial da União. 1967;
 12. Brasil. Ministério da Saúde. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário no comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos. Diário Oficial da União. 1973;
 13. Brasil. Ministério da Saúde. Lei Federal nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. Diário Oficial da União. 1976;
 14. Brasil. Ministério da Saúde. A Fitoterapia no SUS eo Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília Ministério da Saúde [Internet]. 2006;148. Available from: http://dab.saude.gov.br/docs/geral/fitoterapia_no_sus.pdf
 15. Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. 1995;
 16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Atualiza a regulamentação de registro de medicamentos fitoterápicos e define o medicamento fitoterápico tradicional. Diário Oficial da União. 2000;
 17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. 2004;
 18. Bezerra Carvalho AC, Ramalho LS, De Oliveira Marques RF, Silvério Perfeito JP. Regulation of herbal medicines in Brazil. J Ethnopharmacol. 2014;47(PART B):503–6.
 19. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro

- de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Diário Oficial da União. 2014;
20. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União. 2014;
 21. Zhang L, Yang M, Gao J, Jin S, Wu Z, Wu L, et al. Seasonal variation and gender pattern of phenolic and flavonoid contents in *Pistacia chinensis* Bunge inflorescences and leaves. *J Plant Physiol. Elsevier.*; 2016;191:36–44.
 22. Matias EFF, Alves EF, Silva MKN, Carvalho VRA, Figueredo FG, Ferreira JVA, et al. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Ind Crops Prod. Elsevier.*; 2016;87:45–53.
 23. Alqahtani A, Tongkao-On W, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Li GQ. Seasonal Variation of Triterpenes and Phenolic Compounds in Australian *Centella asiatica* (L.) Urb. *Phytochem Anal.* 2015;26(6):436–43.
 24. Similien A, Shannon DA, Wood CW, Rimando AM, Kempainen BW, Santen E, et al. Shade, Irrigation, and Nutrients Affect Flavonoid Concentration and Yield in American Skullcap. *Crop Sci.* 2016;
 25. Letaief H, Zemni H, Mliki A, Chebil S. Composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv «Maltaise demi-sanguine» juice. A comparison between organic and conventional farming. *Food Chem. Elsevier*; 2016;194:290–5.
 26. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal.* 2014;22(3):296–302.
 27. Andrade EF, Souza Leone R, Ellendersen LN, Masson ML. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Ind Crops Prod.* 2014;62:499–506.
 28. Majeed M, Hussain AI, Chatha SAS, Khosa MKK, Kamal GM, Kamal MA, et al.

- Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi J Biol Sci.* King Saud University; 2015;23(3):389–96.
29. Tripathy V, Basak BB, Varghese TS, Saha A. Residues and contaminants in medicinal herbs - A review. *Phytochem Lett.* Phytochemical Society of Europe; 2015;14:67–78.
 30. Ting A, Chow Y, Tan W. Microbial and heavy metal contamination in commonly consumed traditional Chinese herbal medicines. *J Tradic Chinese Med.* 2013;33(1):119–24.
 31. Rao MM, Meena AK, Galib. Detection of toxic heavy metals and pesticide residue in herbal plants which are commonly used in the herbal formulations. *Environ Monit Assess.* 2011;181(1–4):267–71.
 32. Han J, Pang X, Liao B, Yao H, Song J, Chen S. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding. *Nat Sci Reports.* Nature Publishing Group; 2016;6(January):18723.
 33. Lesiak AD, Cody RB, Ubukata M, Musah RA. Direct analysis in real time high resolution mass spectrometry as a tool for rapid characterization of mind-altering plant materials and revelation of supplement adulteration – The case of Kanna. *Forensic Sci Int.* Elsevier Ireland Ltd; 2016;260:66–73.
 34. Park H-J, Cho S-H, Lee JH, Hwang IS, Han KM, Yoon C-Y, et al. Screening for Corticosteroid Adulterants in Korean Herbal Medicines. *J Forensic Sci.* 2016;61(1):226–9.
 35. Fung FY, Linn YC. Developing Traditional Chinese Medicine in the Era of Evidence-Based Medicine : Current Evidences and Challenges. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2015;2015.
 36. Dhama N, Mishra AD. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? *J Herb Med.* Elsevier GmbH.; 2015;5(2):118–27.
 37. World Health Organization. WHO good manufacturing practices for

- pharmaceutical products: main principles. WHO technical Report Series 986. WHO; 2014. p. Annex 2.
38. Tistaert C, Dejaegher B, Heyden Y Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal Chim Acta*. Elsevier B.V.; 2011;690(2):148–61.
 39. Govindaraghavan S, Sucher NJ. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. *Epilepsy Behav*. Elsevier Inc.; 2015;52:363–71.
 40. Applequist WL, Miller JS. Selection and authentication of botanical materials for the development of analytical methods. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(13):4419–28.
 41. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. Elsevier B.V.; 2010;81(6):462–71.
 42. TROPICOS. *Cynara scolymus*. Missouri Botanical Garden. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/2700661>
 43. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Cynara scolymus* L., folium. 2011;
 44. EDQM. European Pharmacopoeia. 7 edição. 2011.
 45. Arenas PM, Molares S, Aguilar Contreras A, Doumecq B, Gabrielli F. Ethnobotanical, micrographic and pharmacological features of plant-based weight-loss products sold in naturist stores in Mexico City: the need for better quality control. *Acta Bot Brasilica*. 2013;27(3):560–79.
 46. Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;109(1):60–71.
 47. Trojan-Rodrigues M, Alves TLS, Soares GLG, Ritter MR. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2012;139(1):155–63.
 48. Maia E, Francisco J, Pires T. O uso de espécies vegetais para fins medicinais

- por duas comunidades da Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. *Rev Biol e Ciências da terra*. 2011;11.
49. Benítez G, González-Tejero MR, Molero-Mesa J. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(1):87–105.
 50. Rangel Lima I, Silva IB, Mardonny B de OC, Lima RMPL, Lima LS, Maia MB de S, et al. Medicinal plants used in hepatic dysfunction. *African J Pharm Pharmacol*. 2016;10(7):80–7.
 51. Calvo MI, Akerreta S, Cavero RY. The pharmacological validation of medicinal plants used for digestive problems in Navarra, Spain. *Eur J Integr Med*. 2013;5(6):537–46.
 52. Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Funez LA, de Gasper AL, et al. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *J Ethnopharmacol*. Elsevier; 2015;164:136–46.
 53. Azizi H, Keshavarzi M. Ethnobotanical study of medicinal plants of Sardasht, Western Azerbaijan, northwestern Iran. *J Herb Drug*. 2015;6(2):121–8.
 54. Rondanelli M, Opizzi A, Faliva M, Sala P, Perna S, Riva A, et al. Metabolic management in overweight subjects with naive impaired fasting glycaemia by means of a highly standardized extract from cynara scolymus: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Phyther Res*. 2014;28(1):33–41.
 55. Rondanelli M, Giacosa A, Opizzi A, Faliva MA, Sala P, Perna S, et al. Beneficial effects of artichoke leaf extract supplementation on increasing HDL-cholesterol in subjects with primary mild hypercholesterolaemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Int J Food Sci Nutr*. 2013;64(February):7–15.
 56. Holtmann G, Adam B, Haag S, Collet W, Grünewald E, Windeck T. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: A six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18(11–12):1099–105.

57. Saénz Rodríguez T, García Giménez D, de la Puerta Vázquez R. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*. 2002;9(8):687–93.
58. Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Marakis G, Booth JCL. Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome and improves quality of life in otherwise healthy volunteers suffering from concomitant dyspepsia: a subset analysis. *J Altern Complement Med*. 2004;10(4):667–9.
59. Negro D, Montesano V, Grieco S, Crupi P, Sarli G, De Lisi A, et al. Polyphenol Compounds in Artichoke Plant Tissues and Varieties. *J Food Sci*. 2012;77(2).
60. Abu-Reidah IM, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2013;141(3):2269–77.
61. Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2011;126(2):417–22.
62. Park CM, Song YS. Luteolin and luteolin-7-o-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/Ap-1/PI3K-AKT signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract*. 2013;7(6):423–9.
63. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(3):1122–8.
64. Anvisa. Seleção e determinação do teor de marcadores em extratos de *Cynara scolymus* [Internet]. [cited 2015 Nov 5]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/produtos/medicamentos-fitoterapicos/orientacoes>
65. Botsaris A, Alves L. *Cynara scolymus* L. (Alcachofra). *Rev Fitos*. 2007;3.
66. Tropicos, Missouri Botanical Garden. *Rhamnus purshiana* DC. [Internet]. 2016

- [cited 2016 Nov 21]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/27500188>
67. Malik EM, Muller CE. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Med Res Rev.* 2016;36(4):705–48.
 68. Van Gorkom BAP, De Vries EGE, Karrenbeld A, Kleibeuker JH. Review article: Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 1999. p. 443–52.
 69. Colalto C. Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacological Research.* 2010. p. 207–27.
 70. Brasil, Anvisa. Memento fitoterápico. 1ª. Brasília, DF; 2016.
 71. Bradley P. *British Herbal Compendium.* Bournemouth: British Herbal Medicine Association; 1992.
 72. United States Pharmacopeial Convention. *Dietary supplements: Cascara.* 2007.
 73. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira.* Brasília, DF; 2002.
 74. Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-mor RLM. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(1):127–34.
 75. Perfeito JPS. O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento. Brasília, Dissertação de Mestrado [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade de Brasília. 2012;
 76. Ritter M, Liro R, Roque N, Nakajima J, Souza-Buturi F, OLIVEIRA. Mikania in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5378>
 77. TROPICOS. Mikania glomerata Spreng. Missouri Botanical Garden. 2015. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5378>
 78. Gasparetto JC, Campos FR, Budel JM, Pontarolo R. Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: Estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas

- de fitoterapia do Brasil. *Brazilian J Pharmacogn.* 2010;20(4):627–40.
79. Ferreira ALDS, Augusto C, Pasa MC. Levantamento etnobotânico nas diferentes realidades de ensino. *Biodiversidade.* 2015;14(3):60–73.
80. Lenz D, Andrade TU, Endringer DC. Centennial Knowledge of Medicinal Plants Held in Communities of Espírito Santo , Brazil. *Ethnobot Res Appl.* 2015;162(March):155–62.
81. Bolson M, Hefler SR, Dall'Oglio Chaves EI, Gasparotto Junior A, Cardozo Junior EL. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2015;161:1–10.
82. Bieski IGC, Leonti M, Arnason JT, Ferrier J, Rapinski M, Violante IMP, et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol.* Elsevier; 2015;173:383–423.
83. Brandão MGL, Cosenza GP, Graef CFF, Netto NL, Monte-Mór RLM. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Brazilian J Pharmacogn.* 2009;19(2 A):478–87.
84. Messias MCTB, Menegatto MF, Prado ACC, Santos BR, Guimarães MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Rev Bras Plantas Med.* 2015;17(1):76–104.
85. Mourão VB, Giraldo GM, Neves LMG, de Gaspi FODG, Rodrigues RAF, Alves AA, et al. Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29(1):30–7.
86. Maiorano V a., Marcussi S, Daher M a F, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes O a., et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol.* 2005;102:364–70.
87. Fierro IM, da Silva a C, Lopes CDS, de Moura RS, Barja-Fidalgo C. Studies on

- the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol.* 1999;66(1):19–24.
88. Tonini Zamprogno T, del Carmen Garcia Lopes A, Lacerda T, Hiura E, da Fonseca LA, Senna T, et al. Activity of *Euterpe edulis* Martius, *Mikania glomerata* Spreng, and *Mikania laevigata* Schultz Bip. Extracts on Gastrointestinal Nematodes *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*. *Arch Clin Infect Dis.* 2015;10(3).
89. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ciências Farm.* 2005;41(1):85–94.
90. Slomp L, Pereira PS, Franca S de C, Zingaretti S, Belebony RO. In vitro nematocidal effects of medicinal plants from Sao Paulo state, Brazil. *Pharm Biol.* 2009;47(3):230–5.
91. Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Rezin GT, Rocha J, Citadini-Zanette V, et al. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. *J Med Food.* 2008;11(4):761–6.
92. Chagas-Paula DA, Oliveira TB de, Faleiro DPV, Oliveira RB De, Da Costa FB. Outstanding anti-inflammatory potential of Asteraceae species through the potent dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Planta Med.* 2015;81:1296–307.
93. Santana LCLR, Brito MRM, Oliveira GLS, Citó AMGL, Alves CQ, David JP, et al. *Mikania glomerata*: phytochemical, pharmacological and Neurochemical Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014.
94. Salgado HRN, Roncari AFF, Moreira RRD. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. *Receiv* 02/08/05 *Accept* 08/09/05 *Rev.* 2005;15(3):205–8.
95. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of

- infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027–31.
96. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005;97(2):305–11.
 97. Souza DH, Yamamoto CH, Pinho J de JR, Alves MS, Araújo A da LA, Sousa OV. Atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata* Sprengel. Hu rev. 2006;32(1):11–4.
 98. Soares de Moura R, Costa SS, Jansen JM, Silva C a, Lopes CS, Bernardo-Filho M, et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. J Pharm Pharmacol. 2002;54(2):249–56.
 99. Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº2 de 13 de maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado.” Diário Oficial da União. 2014;
 100. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia brasileira. 1st ed. ANVISA, editor. Brasília; 2011.
 101. Do Amaral MDPH, Piresvieira F, Leite MN, Do Amaral LH, Pinheiro LC, Fonseca BG, et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. Brazilian J Pharmacogn. 2009;19(2 B):607–11.
 102. Bolina RC, Garcia E de F, Duarte MGR. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. Brazilian J Pharmacogn. 2009;19(1B):294–8.
 103. Melo LV, Sawaya ACHF. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). Brazilian J Pharmacogn. Sociedade Brasileira de Farmacognosia; 2015;25(2):105–10.
 104. Bertolucci SK, Pereira AB, Pinto JE, de Aquino Ribeiro JA, de Oliveira AB, Braga FC. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of

- cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. *Planta Med.* 2009;75(3):280–5.
105. Bertolucci SK V, Pereira ABD, Pinto JEBP, Oliveira AB, Braga FC. Isolation and HPLC quantitation of kaurane-type diterpenes and cinnamic acid derivatives of long-term stored leaves of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. *An Acad Bras Cienc.* 2013;85(2):473–85.
 106. Matos P, Mahoney B, Chan Y, Day D, Cabral M, Martins C, et al. New Non-Toxic Semi-Synthetic Derivatives from Natural Diterpenes Displaying Anti-Tuberculosis Activity. *Molecules.* 2015;20(10):18264–78.
 107. Gasparetto JC, Francisco TMG De, Pontarolo R. Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch . Bip . ex Baker. *J Med Plants Res.* 2013;7(13):753–65.
 108. Tropicos, Missouri Botanical Garden. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. 2017. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/27903494>
 109. Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rubiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. 2017. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24620>
 110. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC., cortex. 2015.
 111. Mur E, Hartig F, Eibl G. Randomized Double Blind Trial of an Extract from the Pentacyclic Alkaloid- Chemotype of *Uncaria tomentosa* for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2011;29(4):1–10.
 112. Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF inhibitor through NF- κ B. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(3):685–93.
 113. Bors M, Bukowska B, Pilarski R, Gulewicz K, Oszmiański J, Michałowicz J, et al. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2202–11.
 114. Paula LCL, Fonseca F, Perazzo F, Cruz FM, Cubero D, Trufelli DC, et al. *Uncaria*

- tomentosa (cat's claw) improves quality of life in patients with advanced solid tumors. *J Altern Complement Med*. 2015;21(1):22–30.
115. Santos Araújo MDC, Farias IL, Gutierrez J, Dalmora SL, Flores N, Farias J, et al. *Uncaria tomentosa* - Adjuvant treatment for breast cancer: Clinical trial. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012.
 116. Chang C-W, Yeh Y-Y, Chang L-C, Hsu M-C, Wu Y-T. Rapid determination of oxindole alkaloids in cat's claw by HPLC using ionic liquid-based microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2017;e3925. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.3925>
 117. Luna-Palencia GR, Huerta-Heredia AA, Cerda-García-Rojas CM, Ramos-Valdivia AC. Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. *Biotechnol Lett*. 2013;35(5):791–7.
 118. Kaiser S, Verza SG, Moraes RC, Pittol V, Peñaloza EMC, Pavei C, et al. Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box-Behnken design. *Ind Crops Prod*. 2013;48:153–61.
 119. Pavei C, Kaiser S, Borré GL, Ortega GG. Validation of a LC method for polyphenols assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*). *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2010;33(17):1551–61. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2010.503753>
 120. Hoyos MN, Sanchez-Patan F, Masis RM, Martin-Alvarez PJ, Ramirez WZ, Monagas MJ, et al. Phenolic assesment of *Uncaria tomentosa* L. (cat's claw): Leaves, stem, bark and wood extracts. *Molecules*. 2015;20(12):22703–17.
 121. Kaiser S, Carvalho Anderson Ramos, Pittol V, Dietrich F, Manica F, Machado MM, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (cat's claw): Chemotype relevance. *J Ethnopharmacol*. 2016;189:90–8.
 122. Peñaloza EMC, Kaiser S, De Resende PE, Pittol V, Carvalho ÂR, Ortega GG. Chemical Composition variability in the *Uncaria tomentosa* (cat's claw) wild population. *Quim Nova*. 2014;37(8):1410–6.

123. Montserrat-De La Paz S, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Quilez AM, Muriana FJG, Garcia-Gimenez MD, et al. Pharmacological effects of mitraphylline from *Uncaria tomentosa* in primary human monocytes: Skew toward M2 macrophages. *J Ethnopharmacol. Elsevier*; 2015;170:128–35.
124. Bacher N, Tiefenthaler M, Sturn S, Stuppner H, Ausserlechner MJ, Kofler R, et al. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2005;132:615–22.
125. Kozielwicz P, Paradowska K, Erić S, Wawer I, Zloh M. Insights into mechanism of anticancer activity of pentacyclic oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* by means of a computational reverse virtual screening and molecular docking approach. *Monatshefte fur Chemie.* 2014;145(7):1201–11.
126. Montserrat-De La Paz S, Fernandez-Arche A, De La Puerta R, Quilez AM, Muriana FJ, Garcia-Gimenez MD, et al. Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils. *Phytomedicine.* 2016;23(2):141–8.
127. Rojas-Duran R, Gonzalez-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(3):801–4.
128. Wurm M, Kacani L, Laus G, Keplinger K, Dierich MP. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. *Planta Med.* 1998;64(8):701–4.
129. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol.* 1998;64(1):23–34.
130. United States Pharmacopeial Convention. Dietary supplements: Cat's claw. 39 NF 34. U.S. Pharmacopeia Convention, editor. 2016. 6540-6541 p.
131. ANVISA. Consulta de produtos - Medicamentos [Internet]. Available from: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp

132. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 71 de 22 de dezembro de 2009. Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos. Diário Of da União. 2009;
133. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 47 de 8 de setembro de 2009. Estabelece regras para a elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. Diário Oficial da União. 2009;
134. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição. ANVISA. 2010.
135. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos bioanalíticos.” Diário Oficial da União. 2003;
136. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized tripartite guideline, Topic Q2B; Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996;
137. Gallo L, Ramírez-rigo MV, Wilson E, Piña J, Allemandi D, Bucalá V. Spray-Dried Cascara sagrada Extract for Direct Compression : Tablet Formulation and a Simple HPLC Method for Tablet Performance Evaluation. *Int J Res Pharm Biomed Sci.* 2013;4(4):1360–70.
138. Bandeira F, Gomes L, Barros Y, Martins D, Magalhães P, Silveira D, et al. Validação de método analítico para determinação de cumarina em xarope contendo *Mikania glomerata*. Brasília, DF: 20º Congresso de Iniciação Científica da UnB; 2014.
139. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* 2nd ed. Springer, editor. New York; 2001.
140. Tropicos, Missouri Botanical Garden. *Rhamnus purshiana* DC [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 17]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/27500188>
141. Brasil. Lei 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências.

Diário Oficial da União.

142. Silva Naves J, Fiolle A, Lustosa F, Godinho M, Filho J. The retail pharmacy market in the Brazilian Federal District. *Pharm Regul Aff.* 2015;4(4).
143. Kim JH, Chung CH, Lau CH, Goggins WB, Lau JTF, Griffiths SM. Adverse events and poisoning from over-the-counter traditional Chinese medicine: a population-based survey. *Hong Kong Med J.* 2016;22(1):23–8.
144. Agbabiaka T, Wider B, Watson LK, Goodman C. Concurrent use of prescription drugs and herbal medicinal products in older adults: a systematic review protocol. *Syst Rev. Systematic Reviews;* 2016;1–5.
145. Volpato L, Martins L, Mialhe F. Bulas de medicamentos e profissionais de saúde: ajudam ou complicam a compreensão dos usuários? *Rev Ciências Farm Básica e Apl.* 2010;30(3):309–14.
146. Raynor DK, Dickinson R, Knapp P, Long AF, Nicolson DJ. Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? *BMC Med. BioMed Central Ltd;* 2011;9(1):94.
147. ANVISA. Bula padrão - *Cynara scolymus*. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/bulas-padrao-de-medicamentos-fitoterapicos>
148. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência T e IE. *Uso Racional de medicamentos: temas selecionados. Uso racional de medicamentos: temas selecionados.* Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
149. Alvarenga FCR, Garcia EDF, Bastos Emaf, Grandi TSM, Duarte MGR. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. *Brazilian J Pharmacogn.* 2009;19(2 A):442–8.
150. Allen JR L V, Popovich NG, Ansel HC. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.* 8th ed. Artmed, editor. Porto Alegre; 2007. 775 p.
151. Aulton ME. *Delineamento de formas farmacêuticas.* 2nd ed. Artmed, editor. Porto Alegre; 2005. 677 p.

152. Desai PM, Liew CV, Heng PWS. Review of Disintegrants and the Disintegration Phenomena. *J Pharm Sci.* 2016;1–11.
153. Schutz K, Muks E, Carle R, Schieber A. Quantitative Determination of Phenolic Compounds in Artichoke-Based Dietary Supplements and Pharmaceuticals by High-Performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem.* 2006;54:8812–7.
154. Marakis G, Walker AF, Middleton RW, Booth JCL, Wright J, Pike DJ. Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. *Phytomedicine* [Internet]. 2002;9(8):694–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304701762>
155. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CP 163 de 11 de abril de 2016. Propostas de monografias de plantas medicinais da Farmacopeia brasileira - Drogas vegetais. 2016;
156. Pagano I, Piccinelli AL, Celano R, Campone L, Gazzero P, Falco E, et al. Chemical profile and cellular antioxidant activity of artichoke by-products. *Food Funct.* 2016;7(12):4841–50.
157. Petrovic S, Mucaji P, Ana C, Sokovic M. Food Chemistry Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem.* 2008;107:861–8.
158. Falco B De, Incerti G, Amato M, Lanzotti V. Artichoke : botanical , agronomical , phytochemical , and pharmacological overview. *Phytochem Rev.* Springer Netherlands; 2015;
159. Kaymaz MB, Kandemir FM, Pamukçu E, Eroksuz Y, Ozdemir N. Effects of Aqueous Artichoke (*Cynara scolymus*) Leaf Extract on hepatic damage generated by Alpha-Amanitine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2017;23(1):155–60.
160. Noldin VF, Cachinel Filho V, Monache FD, Benassi JC, Christmann IL, Pedrosa RC, et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* cultivadas no Brasil. *Quim Nova.* 2003;26(3):331–4.
161. Costa RS, Ozela EF, Barbosa WLR, Pereira NL, Silva Júnior JOC.

- Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2009;90(3):169–74.
162. Guimarães E, Rodrigues C, Dias L, Dornellas C, Castro H, Cabral L, et al. Developing and Validating Analytical Methods for the Chemical Quality Control of Phytotherapies Containing Artichoke Dry. *Rev Fitos.* 2007;1(2):64–77.
163. Carvalho J, Gosmann G, Schenkel E. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: UFRGS/ UFSC, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5th ed. Porto Alegre/ Florianópolis; 2004. p. 371–400.
164. Zwaving J. Recent developments in the analysis of anthraquinone derivatives. *Pharmacology.* 1980;20(1):65–75.
165. Gasparetto JC, Guimarães De Francisco TM, Campos FR, Pontarolo R. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical pr. *J Sep Sci.* 2011;34(7):740–8.
166. Cho JH, Lee JY, Sim SS, Whang WK, Kim CJ. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010;23(3):190–9.
167. Xie PS, Leung AY. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica. *J Chromatogr A.* 2009;1216(11):1933–40.
168. Guo L, Duan L, Dou LL, Liu L Le, Yang H, Liu EH, et al. Quality standardization of herbal medicines using effective compounds combination as labeled constituents. *J Pharm Biomed Anal. Elsevier B.V.;* 2016;129:320–31.
169. Long F, Yang H, Xu Y, Hao H, Li P. A strategy for the identification of combinatorial bioactive compounds contributing to the holistic effect of herbal medicines. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2015;5(January):12361.