



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARIA DO ROSÁRIO SILVEIRA BRITTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
O CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS
DERIVADOS DE *Symphytum officinale* L. (CONFREI)**

Recife

2017

MARIA DO ROSÁRIO SILVEIRA BRITTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
O CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS
DERIVADOS DE *Symphytum officinale* L. (CONFREI)**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, com requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica na área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Britto, Maria do Rosário Silveira

Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o controle de qualidade da droga vegetal e produtos derivados de *Symphytum officinale* L. (Confrei) / Maria do Rosário Silveira Britto. – 2017.

72 f. : il.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2017.

Inclui referências.]

1. Plantas medicinais 2. Farmacologia I. Soares, Luiz Alberto Lira (orientador) II. Título.

581.34

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2017 - 665

FOLHA DE APROVAÇÃO
MARIA DO ROSÁRIO SILVEIRA BRITTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
O CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS
DERIVADOS DE *Symphytum officinale* L. (CONFREI)**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, com requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica na área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Aprovada em 31 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares/UFPE

Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira/UFPE

Prof. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque/UFPE

"Dedico ao meu esposo, José Cavalcanti Britto que me apoiou nos momentos difíceis, as minhas filhas, Daniele e Izabele que me iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter tido projetos para a minha vida e para a vida de tantas pessoas. E por ter me dado paz, capacidade e saúde para concluir este sonho e tantos outros, além de ter me protegido nos momentos mais difíceis. Obrigada, Senhor! Não tem como Te agradecer somente com palavras, por tudo que nos proporciona, por isso o nosso viver deve ser um constante agradecimento.

Ao orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, meu agradecimento pela oportunidade em realizar esta pesquisa, amizade, orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque, meu agradecimento pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira, que desde o princípio me apoiou e contribuiu plenamente para o meu crescimento profissional.

A doutoranda do laboratório, Júlia Sousa, por toda ajuda com os experimentos e por estar sempre disposta, muito obrigada pelo seu carinho e amizade, você faz parte deste trabalho.

A Wliana Alves agradeço pela grande ajuda nos ensaios deste trabalho.

A Isabelle Ferraz e a todos que fazem parte do Laboratório de Farmacognosia e da Central Analítica (NUDATEF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas pela ajuda oferecida sempre que solicitado.

Aos colegas de pós-graduação, Paulo Aires, Flávia Sales e demais colegas pela amizade, companheirismo e agradável convivência, tão importante no período de duração do curso.

Ao Laboratório do NCQMC (Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos) pela ajuda na utilização dos equipamentos.

A Maria Luiza e Thaisa Cardoso do Laboratório do NCQMC (Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos), pela ajuda durante este trabalho.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN/PE através de Lúcia Francelino pela doação do reativo para utilização neste trabalho.

À minha família e amigos pessoais, que me apoiaram em todos os momentos difíceis da minha trajetória de vida, a minha irmã Celeste Silveira e à minha irmã de coração Socorro Leite que me incentivaram durante a pesquisa.

Agradeço aos professores, colegas farmacêuticos, colegas de trabalho, familiares e amigos que porventura não foram citados, mas contribuíram de alguma maneira na concretização deste trabalho, mesmo que seja com um simples sorriso no rosto.

Muito obrigada a todos!

“Há medicamentos para toda a espécie de doenças, mas, se esses medicamentos não forem dados por mãos bondosas, que desejam amar, não será curada a mais terrível das doenças: a doença de não se sentir amado”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Confrei (*Symphytum officinale* L.) é uma planta que pertence a família Boraginaceae sendo utilizada na fitoterapia brasileira por várias atividades terapêuticas como cicatrizante, anti-inflamatória e emoliente. Em razão do interesse crescente pelo uso de plantas medicinais, o controle de qualidade de materiais vegetais tem papel fundamental na garantia do uso seguro e da eficácia destes produtos. O presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar metodologia por espectrofotometria (UV-VIS) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de alantoína aplicada ao controle de qualidade da droga vegetal de *S. officinale*. As características físico-químicas foram avaliadas segundo metodologias presentes na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010). Os resultados mostraram que a droga avaliada está dentro dos limites aceitáveis segundo especificado no compêndio, não apresentando presença significativa de material estranho (<2%), obtendo teor de cinzas totais de $17,49 \pm 3,93\%$, cinzas insolúveis em ácido igual a $3,46 \pm 2,76\%$; e umidade residual de $9,78 \pm 2,79\%$. O material vegetal apresentou tamanho médio de partícula de $433 \mu\text{m} \pm 34,00 \mu\text{m}$. O extrato hidroalcoólico obteve pH de 6,46, densidade de 0,9241 g/mL e o resíduo seco de $0,5467 \pm 4,60\%$. A prospecção fitoquímica das folhas da espécie mostrou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, taninos hidrolisáveis e, o objeto desse estudo, alantoína. A análise quantitativa de alantoína por UV-VIS investigou a influência do solvente e a proporção do mesmo (solução hidroalcoólica a 50% e 70%), assim como a temperatura de extração (50 °C e 85 °C) para o método extrativo (refluxo). O resultado do teor por espectrofotometria foi de 2,18 g% e por CLAE, de 0,22 g%. Os resultados da validação espectrofotométrica e cromatográfica atenderam às exigências da RE 166/17.

Palavras-chave: *Symphytum officinale*. Espectrofotometria. CLAE. Controle de Qualidade. Validação.

ABSTRACT

Confrei (*Symphytum officinale* L.) is a plant that belongs to the Boraginaceae family and is used in Brazilian herbal medicine for several therapeutic properties, such as cicatrizant, anti-inflammatory and emollient. Due to the increasing concern in the use of medicinal plants, the quality control of vegetal materials has a fundamental role in the ensuring of safe use and effectiveness of the products. The objective of this study was to evaluate spectrophotometry (UV-VIS) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the quantification of allantoin applied to the quality control of leaves and extracts of *S. officinale*. The results showed that the drug evaluated was in acceptable limits as specified in compendium, with no significant presence of foreign material (<2%), obtaining a total ash content of $17.49 \pm 3.93\%$, insoluble ash in acid to $3.46 \pm 2.76\%$; and, presenting a residual moisture of $9.78 \pm 2.79\%$. The vegetal material had an average particle size of $433 \mu\text{m} \pm 34.00 \mu\text{m}$. The hydroalcoholic extract obtained a pH of 6.46, a density of 0.9241 g/mL and the dried residue, $0.5467 \pm 4.60\%$. A phytochemical prospection of the leaves of the species demonstrated a presence of flavonoids, cinnamic derivatives, saponins, hydrolysable tannins and, the object of study, allantoin. The quantitative analysis of allantoin by UV-VIS investigated the influence of the solvent and its proportion (hydroalcoholic solution at 50% and 70%), as well as the extraction temperature (50 °C and 85 °C) for the extractive method (reflux). The result of the spectrophotometric content was 2.18 g% and by HPLC 0.22 g%. The results of spectrophotometric and chromatographic validation were suitable with the requirements of RE 166/17.

Keywords: *Symphytum officinale*. Spectrophotometry. HPLC. Quality control. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Symphytum officinale</i> L. com destaque para as folhas, flores e raiz.	21
Figura 2 - Estrutura química da alantoína.	24
Figura 3 - Distribuição granulométrica da amostra de folhas de <i>Symphytum officinale</i>	42
Figura 4 - Curva de retenção e passagem da amostra de folhas de <i>Symphytum officinale</i>	43
Figura 5 - Cromatograma para avaliação de flavonoides em folhas de <i>S. officinale</i>	46
Figura 6 - Cromatograma para avaliação de taninos condensados em folhas de <i>S. officinale</i>	47
Figura 7 - Cromatograma para avaliação de taninos hidrolisáveis em folhas de <i>S. officinale</i>	47
Figura 8 - Cromatograma para avaliação de terpenos esteroides em folhas de <i>S. officinale</i>	48
Figura 9 - Cromatograma para avaliação de de cumarinas em folhas de <i>S. officinale</i>	48
Figura 10 - Cromatograma para avaliação derivados cinâmicos em folhas de <i>S. officinale</i>	49
Figura 11 - Cromatograma para avaliação de saponinas em folhas de <i>S. officinale</i>	50
Figura 12 - Cromatograma para avaliação da alantoína em folhas de <i>S. officinale</i>	51
Figura 13 – Gráfico de Paretos (A) e Superfície de Resposta (B) obtidos para a avaliação do teor de alantoína frente ao diferentes condições de etanol (%) e temperatura (°C).	53
Figura 14 - Espectro de varredura da amostra (confrei) e padrão (alantoína).	54
Figura 15 - Curva de calibração média obtida do padrão de Alantoína.	55
Figura 16 - Curva de calibração média do extrato de <i>Symphytum officinale</i> a 70% e 85 °C.	56
Figura 17 - Curvas de linearidade e especificidade médias obtidas para a amostra (confrei) e amostra+padrão por Espectrofotometria.	57
Figura 18 - Cromatogramas do extrato de <i>S. officinale</i> (1), extrato de <i>S. officinale</i> fortificado com o padrão de alantoína (2) e o padrão alantoína (3), evidenciados em 210 nm.	60

Figura 19 - Espectro de varredura do pico correspondente a alantoína na amostra de <i>S. officinale</i>	60
Figura 20 - Cromatograma do extrato de <i>S. officinale</i> evidenciado em 350 nm.	61
Figura 21 - Espectro de varredura dos picos evidenciados em 350 nm. Pico em 12,78 min (A) e em 10,41 min (B).	61
Figura 22 - Curva de linearidade média obtida para o padrão (alantoína) por CLAE.	62
Figura 23 - Curva de linearidade média obtida para a amostra (confrei) por CLAE.	62
Figura 24 - Curvas de linearidade e especificidade médias obtidas para a amostra (confrei) e amostra+padrão por CLAE.....	63
Quadro 1 - Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados para obtenção do perfil fitoquímico das folhas de <i>S. officinale</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos ensaios físico-químicos realizadas para as folhas de <i>Symphytum officinale</i> (Perda por dessecação, Cinzas Totais e Cinzas Insolúveis em Ácido.	44
Tabela 2 - Resultados das análises de caracterização da Solução Extrativa obtida com etanol a 70% e à 85 °C da amostra de <i>Symphytum officinale</i>	45
Tabela 3 – Matriz do desenho experimental para otimização do método de quantificação de alantoína em folhas de <i>S. officinale</i>	52
Tabela 4 - Resultados de absorvância obtidos para a curva de calibração do padrão de Alantoína.	55
Tabela 5 - Resultados de absorvância obtidos para a curva de calibração do extrato das folhas de <i>Symphytum officinale</i> a 70% e 85 °C.	56
Tabela 6 - Resultados de teor, calculados para o ensaio de precisão por Espectrofotometria.	58
Tabela 7 - Resultados obtidos no teste de recuperação para alantoína na solução amostra de folhas de <i>S. officinale</i>	58
Tabela 8 - Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas de <i>S. officinale</i>	59
Tabela 9 - Resultados de teor, calculados para o ensaio de precisão por CLAE.	64
Tabela 10 - Resultados obtidos no teste de recuperação para alantoína na solução amostra de folhas de <i>S. officinale</i>	64
Tabela 11 - Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas de <i>S. officinale</i>	65

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Alcalóides Pirrolizidínicos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DVO	Doença Venoso-Oclusiva
DP	Desvio Padrão
FB5	Farmacopeia Brasileira 5ª edição
g	Gramas
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligramas
min.	Minuto
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
SA	Solução amostra
SEA	Solução estoque da amostra
SP	Solução padrão
SEP	Solução estoque do padrão
U.A.	Unidade de absorvância
v/v	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 <i>Symphytum officinale</i> L.	21
3.2 ALANTOÍNA	23
3.2.1 Métodos de Quantificação de Alantoína em Drogas Vegetais	24
3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	25
3.3.1 Especificidade	26
3.3.2 Linearidade	27
3.3.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	27
3.3.4 Precisão	27
3.3.5 Exatidão	28
3.3.6 Robustez	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL	29
4.2.1 Determinação granulométrica	29
4.2.2 Material Estranho	30
4.2.3 Perda por Dessecação	30
4.2.4 Cinzas Totais	30
4.2.5 Cinzas Insolúveis em Ácido	31
4.3 SOLUÇÃO EXTRATIVA	31
4.3.1 Planejamento Fatorial	32
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA	32
4.4.1 Determinação do pH	32
4.4.2 Determinação da Densidade	32
4.4.3 Resíduo Seco	32
4.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	33
4.5.1 Obtenção dos extratos	33
4.6 DOSEAMENTO DA ALANTOÍNA NAS FOLHAS DE <i>S. officinale</i> POR ESPECTROFOTOMETRIA	35

4.6.1 Obtenção da Solução Estoque	35
4.6.2 Avaliação das Condições Extrativas	35
4.6.3 Solução Amostra	35
4.6.4 Solução Padrão	36
4.6.5 Desenvolvimento da reação	36
4.6.6 Validação da metodologia por Espectrofotometria	36
4.7 DOSEAMENTO DA ALANTOÍNA NAS FOLHAS DE <i>S. officinale</i> POR CLAE	38
4.7.1 Solução Amostra	38
4.7.2 Solução Padrão	38
4.7.3 Avaliação do Método	39
4.7.4 Condições Cromatográficas	39
4.7.5 Validação da metodologia por CLAE	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	42
5.1.1 Análise Granulométrica	42
5.1.2 Material Estranho	43
5.1.3 Perda por Dessecação	43
5.1.4 Cinzas Totais	44
5.1.5 Cinzas insolúveis em ácido	44
5.1.6 Determinação do pH do extrato	44
5.1.7 Determinação da densidade	45
5.1.8 Resíduo seco	45
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRRAFIA EM CAMADA DELGADA	45
5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E TEMPERATURA DE OBTENÇÃO DO EXTRATO	52
5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE ALANTOÍNA POR ESPECTROFOTOMETRIA	54
5.4.1 Validação	54
5.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE ALANTOÍNA POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	59
5.5.1 Avaliação do método	59
5.5.2 Validação	611
6 CONCLUSÃO	66

REFERÊNCIAS.....	67
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem grande interesse clínico e são alternativas terapêuticas extensamente utilizadas na medicina popular ou como matérias-primas para a produção de medicamentos fitoterápicos. Com o passar dos anos o interesse a cerca destes produtos vem aumentando, representando um mercado farmacêutico bastante promissor (COUTO et al., 2009; KLEIN et al., 2010; MARQUES et al., 2012).

Desta forma, o interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), já que a utilização de plantas medicinais fornece uma maneira econômica de cura para a maioria da população, contribuindo significativamente para a atenção primária à saúde (BRASIL, 2006a; MARMITT et al., 2015).

O Ministério da Saúde inserindo o uso das plantas medicinais através da fitoterapia além de outras terapias tem incentivado o uso de terapias integrativas e complementares, tendo implementado em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a) e Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápico (BRASIL, 2006b).

Entre 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou: o crescimento foi de 161%, segundo dados do Ministério da Saúde (PORTAL BRASIL, 2016).

Através do Ministério da Saúde e dos órgãos de vigilância sanitária há uma série de critérios e normatizações para regulamentar o registro de fitoterápicos, sendo assim, as matérias primas vegetais utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos deverão atender a uma série de pré-requisitos de qualidade que assegurem a eficácia terapêutica e a segurança farmacêutica do produto (KLEIN et al., 2010; MARQUES; PETROVICK, 2010). Devido à complexidade dos insumos vegetais e as variações associadas às condições de cultivo, sazonalidade, operação de coleta, variação interespecies e tratamentos empregados para estabilização destes materiais, faz-se necessário a análise de aspectos físico-químicos de drogas vegetais a fim de garantir a qualidade e autenticidade da matéria prima utilizada na produção de medicamentos fitoterápicos (BARNI et al., 2009; MARQUES et al., 2012).

Entre os métodos analíticos destinados a quantificação de compostos químicos em plantas medicinais se destaca a espectrofotometria no visível (UV-VIS). Outras técnicas mais complexas utilizadas merecem destaque, como: as cromatografias a líquido de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e em camada delgada de alta eficiência acoplada a densitometria (BRASIL, 2014; GAEDCKE; STEINHOFF, 2000; KLEIN, 2010).

Na literatura a cromatografia a líquido de alta eficiência é muito utilizada na quantificação de compostos químicos em fitoterápicos e também em outras drogas vegetais (ARAÚJO, 2012; SILVA JR, 2009; SVETLICHNY, 2014).

Os parâmetros relacionados ao controle de qualidade para matérias primas de uso farmacêutico são, muitas vezes, estabelecidos nas Farmacopeias e Compêndios Oficiais. No caso das matérias-primas vegetais oriundas de plantas tradicionais, ou seja, já estudadas química e farmacologicamente, existem monografias específicas que definem critérios de identidade, autenticidade, pureza e teor dos constituintes químicos ativos. O controle de fitoterápicos abrange avaliações da matéria-prima vegetal, tanto a droga como derivado e do produto final (FARIAS, 2001; COFID V, 2015).

Uma vez que, os métodos quantitativos são as principais ferramentas para assegurar a manutenção da segurança e eficácia de drogas vegetais, o trabalho visa desenvolver e avaliar o desempenho de métodos analíticos por espectrofotometria no visível (UV-VIS) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de alantoína na droga vegetal e extratos das folhas de *Symphytum officinale* L.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar as metodologias analíticas para a quantificação de alantoína na droga vegetal e produtos derivados de *Symphytum officinale* L.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar a droga vegetal;
- Realizar a caracterização fitoquímica da droga vegetal;
- Desenvolver e validar metodologia por Espectrofotometria (UV-VIS) para quantificação de alantoína na droga vegetal;
- Desenvolver e validar metodologia por CLAE para quantificação de alantoína na droga vegetal;
- Preparar e caracterizar extratos a partir da droga vegetal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Symphytum officinale* L.

A espécie *Symphytum officinale* L. pertence a família Boraginaceae sendo originária da Europa (Portugal e Inglaterra) e da Ásia temperada, naturalizada nos Estados Unidos e América do Sul e conhecido popularmente no Brasil como confrei, consolda-maior, consólida-maior, orelha-de-asno, erva-do-cardeal, língua-de-vaca e orelha-de-burro (CRUZ, 1995; FONT QUER, 1980). O uso desta planta também foi muito difundido na América do Norte. Chegando ao Brasil no início do século XX trazido pelos imigrantes italianos para alimentação de animais domésticos e como fertilizante (CARVALHO, 2004; CHAVES, 2003).

No Brasil, se adaptou facilmente, em regiões de clima tropical, ocorrendo nos estados do Paraná, Amazonas e, principalmente, São Paulo (ALZUGARAY, 1988), onde é encontrada apenas na forma cultivada (MATOS, 1994).

O estudo morfoanatômico das folhas e raiz (Figura 1) desta espécie foi descrito por Toledo et al. (2003; 2006).

Figura 1 - *Symphytum officinale* L. com destaque para as folhas, flores e raiz.



Fonte Internet: <https://blueberrytalk.files.wordpress.com/2008/05/dscf00021.jpg> (a)

Fonte Internet: <https://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2012/06/confrei-symphytum-officinale.html?m=0> (b)

Fonte internet: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000200009 (c)

No início dos anos 80 o confrei foi amplamente divulgado na mídia como possuidor de propriedades terapêuticas “milagrosas” para várias doenças, incluindo a leucemia e outros tipos de câncer. A partir daí houve um grande aumento no consumo da espécie e muitas pessoas passaram a ingerir o confrei em saladas,

sucos e chás regularmente, além de ser amplamente utilizado como ração para o gado. Entretanto, pouco tempo depois, foram identificados alcaloides pirrolizidínicos (AP) no confrei, que consumidos a longo prazo poderiam causar doença veno-oclusiva (DVO) no fígado e câncer hepático, motivo pelo qual o confrei passou a ser proibido para uso interno. No Brasil essa proibição existe desde 1992 (BRASIL, 1992; CHAVES, 2003; POZETTI, 1991). Sendo assim seu uso foi limitado apenas à preparações de aplicação tópica, considerando as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014).

A planta toda, mas, principalmente, às raízes e rizomas, são atribuídas diversas propriedades terapêuticas, tais como atividade hemostática e anti-inflamatória, devido a presença de taninos e mucilagens e atividade cicatrizante, atribuída à substância alantoína, que atua como regeneradora, estimulando o crescimento de tecidos novos e sadios (DUARTE, 1984).

O confrei tem sido referenciado por suas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, antipsóricas, anti-irritante e hidratante (PILEGGI et al., 2002), antisséptica, bactericida e fungicida, antipruriginosa, emoliente, detergente e calmante (RAHAL et al., 2001). Além de entorse do tornozelo (D'ANCHISE et al., 2007; PREDEL et al., 2005).

Além disso, vem sendo utilizado em medicina veterinária (SHIPOCHLIEV et al., 1981), como também na homeopatia para reparação óssea (LIMA, 2012).

O uso da raiz tem uma longa tradição e vários ensaios clínicos randomizados demonstraram a eficácia e segurança. O extrato da raiz do confrei tem sido utilizado para o tratamento tópico de dor muscular e articular. Está clinicamente provado que alivia dor, inflamação e inchaço de músculos e articulações no caso de artrite degenerativa, mialgia aguda nas costas, entorses, contusões e estirpes após lesões esportivas e acidentes, também em crianças com 3 anos ou mais (FROST, 2013; SMITH, 2011; STAIGER, 2013).

Além da alantoína, diversos outros compostos já foram descritos para a espécie: mucilagens, taninos, saponinas, colina, açúcares, triterpenos, vitaminas, 22 aminoácidos, esteroides, ácidos orgânicos e ácido fólico (GOLDMAN et al., 1985; VAZ, JORGE, 2006).

No extrato etanólico das folhas foram detectadas as seguintes classes de metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenoides. Já o

extrato aquoso contém: saponosídeos e taninos condensados. Compostos fenólicos foram encontrados no rizoma além de amido e lignina (TOLEDO et al., 2006).

A tintura obtida das folhas é preferencialmente utilizada para a formulação de pomadas, cremes e géis (TOLEDO et al., 2006).

A identificação e quantificação de compostos químicos específicos (marcadores) é uma das estratégias mais importante para o controle de qualidade. Geralmente são um ou mais compostos que são os principais responsáveis pela atividade terapêutica (marcadores clínicos) ou que apresentem evidências para contribuição para a resposta clínica (marcadores ativos) (SOARES; FARIAS, 2017).

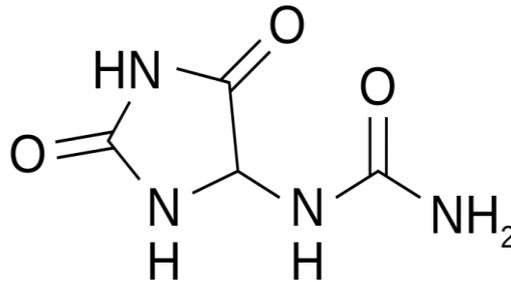
Vários trabalhos também sobre os alcaloides pirrolizidínicos vem sendo publicados para a determinação qualitativa e quantitativa como a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) (BIAVATTI; MIRANDA, 2017).

3.2 ALANTOÍNA

Em 1799, a alantoína (Figura 2) foi isolada pela primeira vez a partir do líquido amniótico de ruminantes (BRUNEL; CAPELLE, 1947). É uma substância que pertence a classe dos ureidos e que comumente é encontrada em boraginaceas. Trata-se de um pó branco, cristalino, também chamado de 5-ureidohidantoina, glioxildiureido ou cordianina. Possui ponto de fusão em 238 °C. Um grama dissolve-se em 190 mL de água e em 500 mL de etanol, sendo mais solúvel nestes solventes a quente. O pH da solução saturada é 5,5 (BERINGER, 1995; MOFFAT et al., 1978; O'NEIL, 2013).

Industrialmente, a alantoína pode ser sintetizada pela oxidação do ácido úrico com permanganato de potássio alcalino (O'NEIL, 2013) ou pela reação do ácido glioxílico com a ureia.

Figura 2 - Estrutura química da alantoína.



Fonte Internet: http://s40.photobucket.com/user/Rodrigoqui/media/alantoína_zpsfwvscncf.png.html

Nas plantas, os ureídeos (como a alantoína e o ácido alantoico) são produtos de degradação das bases púricas, desempenhando papel importante no armazenamento e transporte do nitrogênio, sendo a alantoína bastante comum no reino vegetal (BRUNEL, CAPELLE, 1947). A alantoína é encontrada em vegetais como confrei (GAO et al., 2008; TEIXEIRA, 1985), *Zea mays* (HAGHI; ARSHI; SAFAEI, 2008) e em espécies da família Dioscorea (FU; FERNG; HUANG, 2006).

3.2.1 Métodos de Quantificação de Alantoína em Drogas Vegetais

A espectrofotometria UV-VIS (ultravioleta-visível) é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas (VINADÉ, VINADÉ, 2005). Os métodos espectrofotométricos são comumente utilizados pela simplicidade do procedimento e rapidez das análises. A limitação desse método é a dificuldade de determinação simultânea de dois ou mais componentes na mesma amostra sem separação prévia (BRAGA, 2012)

A cromatografia a líquido de alta eficiência tem como vantagem a rapidez de análise, alta eficiência, reprodutibilidade e sensibilidade, mas possui algumas limitações como o alto custo de equipamento, a necessidade de operador experiente e solventes de alta pureza (CIENFUEGOS, VAITSMAN, 2000).

Para garantia do controle de qualidade de diversos produtos farmacêuticos, incluindo fitoterápicos, são bastante utilizadas as técnicas espectrofotométrica na região do ultravioleta/visível (UV-VIS) e a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (BORBA et al., 2013).

O método de quantificação por espectrofotometria no visível da alantoína no confei, foi baseado no método de BORCHERS no qual consiste na hidrólise alcalina que transforma a alantoína em ácido alantóico com posterior hidrólise ácida após a reação com 2,4 – dinitrofenilhidrazina com a formação do ácido glioxílico (BORCHERS, 1977).

A quantificação da alantoína no chá de bugre foi realizada pelo método de espectrofotometria baseada no método de Borchers (DIAS, 2004; SAITO, 1984) como também o extrato hidroalcoólico de confei para incorporação em géis para tratamento de queimaduras (FERRARI et al., 2012)

O método para a determinação quantitativa de alantoína em lipossomas, géis e cremes foi realizado por espectrofotometria no ultravioleta usando a derivada de segunda ordem (BRAGA, 2012).

Os métodos para determinação da alantoína em amostras biológicas, cosméticas e farmacêuticas abrangeu três categorias principais: espectrofotometria, titulação alcalimétrica e cromatografia a líquido. A adequação e o desenvolvimento dos métodos foi realizada em diferentes tipos de amostras (CHEN; MATSUZEWSKI; KOWALCZYK, 1996).

O método de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a análise qualitativa e quantitativa da alantoína em cabelo e semente de *Zea mays* (milho) (HAGHI; ARSHI; SAFAEI, 2008) foi desenvolvido e quantificada usando tampão como fase móvel, como também a determinação da alantoína no chá de bugre foi baseada na metodologia acima com alterações na fase móvel utilizando água ultra pura (ASSONUMA, 2009).

A avaliação da alantoína pelo método de cromatografia a líquido de alta eficiência para o desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de copaíba e alantoína foi utilizado como fase móvel tampão e metanol sendo adequado para o desenvolvimento e avaliação do método para a quantificação da alantoína (SVETLICHNY, 2014).

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é um procedimento capaz de mostrar através de bases experimentais, que o método é apropriado para a finalidade a que se destina e que

desta forma possa garantir confiabilidade dos resultados obtidos. (BORBA et al., 2013).

Os processos de validação visam a obtenção de uma comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, permitindo adquirir informações confiáveis e interpretáveis das amostras. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método, neste caso estão incluídos os equipamentos, instrumentação específica e reagentes (RIBANI et al., 2004). O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito e em casos de adaptações, deve gerar dados confiáveis e precisos. Algumas situações devem ser estudadas quando são necessárias: adaptações na metodologia já validada, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO et al., 2003).

No Brasil, a validação é um processo regulamentado pela RDC 166/17 e faz indicação sobre a proposta do método em ser apropriado em sua finalidade, bem como sofre ajustes metodológicos em um já existente. Trata-se de um processo sistematizado, que permite que a execução do processo analítico siga os critérios estabelecidos pelas legislações vigentes, permitindo que os procedimentos analíticos sejam reprodutíveis em diferentes laboratórios, de forma precisa e exata, dentro dos limites de confiança (MONTEIRO, 2016). O dado analítico, independente da técnica utilizada deve ser isento de interferências sobre a espécie em questão, ou pelo menos uma interferência possível de ser avaliada.

O “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” RDC nº 166 de 25 de julho de 2017 da ANVISA preconiza os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2015).

3.3.1 Especificidade

Define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, envolvendo a adição de padrão analítico (BRITO et al., 2003), e de medir exatamente um composto em presença de outros

componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

3.3.2 Linearidade

Capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A RDC 166/17 recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $\geq 0,99$ de acordo com as curvas obtidas experimentalmente através do tratamento matemático (BRASIL, 2017).

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

Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito da amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LD avalia mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos e pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O LQ avalia o sinal/ruído somente para processos analíticos que exibem linha de base. Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra em baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, podendo assim avaliar a quantidade mínima possível do analito quantificado (BRASIL, 2017; BRITO et al., 2003). As equações utilizadas no processo de validação são preconizadas pelo ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2017).

3.3.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão para

fármacos e medicamentos são recomendados a serem realizados nos níveis de 80, 100 e 120% como indicado na orientação para a apresentação de amostras e dados analíticos e deve ser realizada como: repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; e, a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.. A precisão de um método analítico deve expressar além dos valores de teor, o Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR%) que deve ser menor que 5%. (BRASIL, 2017).

3.3.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Ao lado da precisão, expressa um nível de confiança dentro de certos limites. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; e, adição de padrão (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

3.3.6 Robustez

Segundo a Anvisa (BRASIL, 2017), a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal e seu desenvolvimento metodológico. Se as mudanças estabelecidas estiverem dentro dos limites de exatidão, e precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e pode ser incorporado ao procedimento (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal constituído das folhas de *Symphytum officinale* L. foi coletado no município de Gravatá (Pernambuco-Brasil). Após a coleta, entre 8:00 e 9:00 horas da manhã o material botânico foi levado para identificação no IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) Herbário Dárdano de Andrade Lima – PE, onde foi depositada uma exsicata sob número de tombamento 91194. Depois de identificado, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante (Modelo Luca 82/480, Lucadema[®]) sob temperatura de 40 °C durante 96 horas. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas tipo Willey (Modelo 340 série 100/08, Adamo[®]) com malha de 10 mesh.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL

Para a caracterização do controle de qualidade físico-químico foram empregados Métodos Gerais em Farmacognosia preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5.ed (FB5, 2010). Os ensaios realizados foram: granulometria, matéria estranha, perda por dessecação, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média, desvio padrão e coeficiente de variação.

4.2.1 Determinação granulométrica

Foram utilizados os tamises de abertura: 850, 600, 425, 250, 150 e 125 µm e a base coletora. Os tamises foram empilhados em ordem crescente de baixo para cima e colocados no aparelho de agitação mecânica.

Para o ensaio, foram pesados cerca de 20 g de amostra e foram submetidas à passagem através do tamis superior de abertura 850 µm. Após tampar o conjunto de tamises, o aparelho foi ligado durante 15 minutos com 60 vibrações por segundo em tamisador vibratório (Bertel[®]). Após o término, cada tamis e o coletor foram pesados e, em seguida, foram calculados os diâmetros médios da amostra. Os dados obtidos para a determinação do diâmetro médio das partículas foram

analisados por métodos gráficos como o histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem.

4.2.2 Material Estranho

A tomada de amostra para o ensaio foi realizada pela técnica de quarteamento descrita em compêndio oficial (FB5, 2010), onde foi pesado cerca de 25 g de folhas de confrei, em seguida esta amostra foi espalhada uniformemente em uma fina camada. Por fim, os materiais estranhos à amostra foram separados manualmente, inicialmente a olho nu e, em seguida com o auxílio de lente de aumento (cinco a dez vezes). O material separado foi pesado e com base no peso da amostra submetida ao ensaio foi calculada a porcentagem de matéria estranha em porcentagem de massa.

4.2.3 Perda por Dessecação

Foram pesados cerca de 2 g de amostra em pesa-filtros previamente dessecados, em seguida, foram submetidos a aquecimento de 105 °C em estufa (Fanem, 315-SE) durante 5 horas. Os pesa-filtros foram resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados. Em seguida foram recolocados em estufa por mais 1 hora, resfriados e novamente pesados. O procedimento foi repetido até obtenção de peso constante. A porcentagem de perda por dessecação foi calculada segundo a equação abaixo:

$$PD = \frac{P1 - P2}{Pa} \times 100 \quad (1)$$

Onde: PD = Perda por Dessecação; P1 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; P2 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação; Pa = peso da amostra antes da dessecação.

4.2.4 Cinzas Totais

Foram colocados cerca de 3 g de folhas trituradas do confrei em cadinhos de porcelana previamente dessecados. A droga foi distribuída uniformemente no fundo

dos cadinhos, em seguida, estes foram levados a aquecimento de $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, seguido de $400\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos e $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 minutos. Após este processo, os cadinhos foram retirados da mufla (Fornitec, série 1282) e resfriados em dessecador a temperatura ambiente, foram pesados e colocados de volta ao aquecimento de $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até obtenção de peso constante. Os teores de cinzas foram calculados segundo a fórmula abaixo:

$$CT = \frac{C2 - C1}{Ca} \times 100 \quad (2)$$

Onde: CT = Teor de Cinzas; C2 = Peso do cadinho com a amostra após incineração; C1= Peso do cadinho vazio; Ca = Peso da amostra antes da incineração.

4.2.5 Cinzas Insolúveis em Ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (v/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro lavando com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original e aquecido em chapa quente e depois incinerado a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Depois foi calculada a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido.

A análise estatística dos dados obtidos (cálculo de média, desvio padrão e coeficiente de variação), elaboração dos gráficos, curvas e histogramas foram realizadas com o auxílio do programa Excel (Microsoft®).

4.3 SOLUÇÃO EXTRATIVA

O pó das folhas de *S. officinale* foi submetido a extração sob refluxo ($T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 1 hora. Foi utilizada proporção droga:solvente 1:50 (p/v) e mistura hidroalcoólica a 70% (v/v) como líquido extrator. Ao final, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e filtrada em algodão para balão volumétrico de 50 mL.

4.3.1 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial foi realizado em dois níveis com duas concentrações de 50% e 70% de etanol e em duas temperaturas de 50 °C e 85 °C.

A matriz do desenho experimental evidenciou as variáveis codificadas e naturais como também o teor de alantoína obtida em cada determinação.

A avaliação da superfície de resposta foi evidenciado a influência da concentração de etanol e a temperatura de extração.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA

4.4.1 Determinação do pH

A determinação do pH da solução extrativa foi realizada em pHmetro (HANNA, pH 21) previamente calibrado, sendo realizada de acordo com o que preconiza a FB 5ª ed. (2010).

4.4.2 Determinação da Densidade

A análise da densidade relativa do extrato foi realizada utilizando picnômetro, conforme metodologia descrita na FB 5ª ed. (2010). Utilizou-se um picnômetro de 5 mL, previamente calibrado, que foi preenchido com água destilada a 25 °C e pesado. A amostra, a uma temperatura de 25 °C, foi transferida para o picnômetro e também pesado. Obteve-se o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 25°C, forneceu o valor da densidade do extrato (BRASIL, 2010a).

4.4.3 Resíduo Seco

O resíduo seco da amostra foi determinado utilizando 5 mL da solução extrativa e aquecida a 130 °C com auxílio da balança de infravermelho (Marte, série ID-V.18). (FB5, 2010).

4.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

4.5.1 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos sob refluxo a 85 °C utilizando etanol como solvente e 1 g de droga vegetal, durante 60 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro qualitativo.

A prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada foi realizada para os seguintes grupos de metabólitos secundários: alcaloides (alantoína), cumarinas, saponinas, terpenos/esteroides, derivados cinâmicos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os sistemas de fases móveis e reveladores foram baseados nas metodologias propostas por Wagner e Bladt (2001) e pela farmacopeia americana (USP, 2017), no qual os padrões correspondentes a cada classe encontram-se descritos no quadro 1.

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (Merck®) e para a análise de alantoína foi utilizada placa de celulose (Merck®), todas de dimensões 5 x 10 cm. A aplicação das amostras e dos padrões foi realizada manualmente com auxílio de capilares. A cuba cromatográfica (Camag®) com as dimensões 10 x 10 cm foi saturada previamente com as respectivas fases móveis pelo menos 30 minutos antes de cada processo de separação.

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados para obtenção do perfil fitoquímico das folhas de *S. officinale*.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5)	Ácido gálico	Cloreto férrico
Taninos condensados	AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica
Flavonoides	AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5)	Quercetina/Rutina	NEU +PEG
Terpenos e Esteroides	Tolueno:AcOEt (70:30)	β-sitosterol	Lieberman Buchard
Derivado cinâmicos	AcOEt: HCOOH:H ₂ O (90:5:5)	Ác.Clorogênico/ Ac. Cafeico	NEU + PEG
Cumarinas	EtOEt:Tolueno:AcOH10% (50:50:50)	Cumarina	KOH + UV
Saponinas	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:11:11:26)	Escina	Lieberman + Δ
Alcaloide (Alantoína)	Ácido butílico:H ₂ O:AcOH (60:25:15)	Alantoína	p-dimetilaminobenzaldeido em metanol 5%.

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; H₂O = Água; AcOH = Ácido acético; EtOEt = Éter etílico; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol; PEG = Propilenoglicol; UV = ultravioleta.

Fonte: próprio autor.

4.6 DOSEAMENTO DA ALANTOÍNA NAS FOLHAS DE *S. officinale* POR ESPECTROFOTOMETRIA

O método de quantificação da alantoína proposto inicialmente por Borchers (1977), e posteriormente empregado para quantificação da alantoína tanto no chá de bugre (DIAS, 2004; SAITO, 1984) quanto no confrei (FERRARI, 2012) foram usados como ponto de partida para este estudo.

4.6.1 Obtenção da Solução Estoque

Cerca de 1,0 g de material vegetal seco e pulverizado foi transferida para balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL e submetida à extração sob refluxo em banho maria (Lucadema) por 20 minutos, a temperatura de 50 e 85 °C, utilizando 15 mL da solução hidroalcoólica 50 e 70% v/v como solvente extrator. Após o primeiro ciclo, a solução foi filtrada com auxílio de algodão para balão volumétrico de 50 mL, e o resíduo+algodão foram submetidos a novo ciclo de extração por mais 20 minutos, repetindo o processo por 3 vezes. Após resfriamento a temperatura ambiente, as frações foram reunidas em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi aferido com o mesmo solvente.

4.6.2 Avaliação das Condições Extrativas

As condições de preparação da amostra para o método espectrofotométrico foram avaliadas através da avaliação da temperatura de extração (50 e 85 °C) e concentração do solvente extrator (solução hidroalcoólica a 50 e 70%, v/v) a fim de obter maior teor de alantoína. Para isso foi utilizado um experimento fatorial do tipo 2², onde a variável dependente foi o teor de alantoína e as variáveis independentes foram a concentração de etanol e a temperatura. Após obtenção dos resultados os dados foram tratados com auxílio do Software Statistica[®] 6.0.

4.6.3 Solução Amostra

Uma alíquota de 1,0 mL da Solução Estoque foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi aferido com água destilada (concentração igual a 1000 µg/mL).

4.6.4 Solução Padrão

Cerca de 125 mg do padrão de alantoína (Sigma[®]) foram pesados e diluídos com água destilada para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, a solução foi submetida à banho de ultrassom (Ultracleaner 1600A, Unique[®]) para completa dissolução do padrão. Por fim, uma alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 200 mL e o volume aferido com água destilada.

4.6.5 Desenvolvimento da reação

Após a adição das alíquotas de 2,5 mL do padrão e da amostra, foi adicionado 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,6 M e aquecida em banho maria a 95 °C ± 1 °C durante 15 minutos. Foi adicionado 1 mL do reativo 2,4 – dinitrofenilhidrazina 0,1% (p/v) e a solução foi aquecida por mais 5 minutos. Após resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução de hidróxido de sódio 2,5 M. Após repouso por 10 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific[®]) a 450 nm. Como branco foi utilizado todos os reativos omitindo o aquecimento.

4.6.6 Validação da Metodologia por Espectrofotometria

Linearidade do Padrão e da Amostra

A curva analítica da alantoína foi obtida com faixa de concentração entre 1,5 mL (3,75 µg/mL) e 4,0 mL (10,0 µg/mL) a partir da diluição da solução estoque do padrão e colocadas em tubo de ensaio para fazer a reação.

A curva analítica da amostra (confrei) foi obtida com diluições realizadas a partir da solução estoque da amostra, com faixa de concentração entre 1,5 mL

(150,99 µg/mL) e 4,0 mL (402,64 µg/mL) e colocadas em tubo de ensaio para fazer a reação.

As soluções da curva de linearidade da alantoína e da amostra foram preparadas em triplicata. Ao final as leituras das absorvâncias foram tratadas estatisticamente com auxílio do Excel 2010 (Microsoft®).

Especificidade

A análise da curva de especificidade foram realizadas a partir da solução estoque da amostra, com faixa de concentração entre 1,5 mL (150,99 µg/mL) e 4,0 mL (402,64 µg/mL) e adicionada de 1,5 mL (3,75 µg/mL) do padrão e colocadas em tubo de ensaio para fazer a reação. Ao final as leituras das absorvâncias foram tratadas estatisticamente com auxílio do Excel 2010 (Microsoft®).

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Na abordagem para os dados de LD e LQ foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média da alantoína para efetuar os cálculos e as equações conforme preconizadas pelo ICH (2005) e Anvisa (BRASIL, 2017).

Precisão - Repetibilidade e Precisão intermediária

Para a análise da repetibilidade foram preparadas 6 amostras independentes, conforme o procedimento da Solução Estoque, seguido de diluição apropriada para obter solução de concentração igual a 251,65 µg/mL (100%). Na precisão intermediária, foram preparadas 3 amostras independentes (na concentração equivalente a 100%), por 2 operadores diferentes e em 2 dias diferentes. O teor foi calculado e expresso em g% de alantoína.

Exatidão

A partir da Solução Estoque foram realizadas diluições apropriadas e obtidas amostras de concentração correspondente a 100%. As amostras obtidas foram adicionadas quantidades conhecidas da solução padrão nas concentrações

correspondentes a 80 a 120% (3,75 a 10,00 µg/mL). Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação (%), de acordo com a equação da reta obtida para a curva de calibração da alantoína.

Robustez

Foram analisadas as amostras na concentração igual a 100% (251,65 µg/mL) submetidas a diferentes variações no procedimento usual. As mudanças realizadas foram: Tempo de leitura (5 min) e (10 min); equipamentos diferentes (Evolution 60s/Thermo[®] e AJ1900/Micronal[®]) e luminosidade (presença de luz e ausência de luz).

4.7 DOSEAMENTO DA ALANTOÍNA NAS FOLHAS DE *S. officinale* POR CLAE

O método de quantificação da alantoína no extrato de *S. officinale* por cromatografia líquida usando como fase móvel acetonitrila e água ultrapura para incorporação em três fórmulas farmacêuticas tópicas (ARAUJO et al., 2012), serviu como base no presente estudo com algumas alterações.

4.7.1 Solução Amostra

Uma alíquota de 1 mL da Solução Estoque da Amostra(SEA) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com a solução metanólica 50% (v/v) (concentração igual a 2000 µg/mL). Por fim, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials.

4.7.2 Solução Padrão

Foi pesado 10 mg do padrão de alantoína (Sigma[®]) e diluído para balão volumétrico de 10 mL com a solução metanólica 50% (v/v) obtendo a Solução Estoque do Padrão (SEP).

Uma alíquota de 0,1 mL da solução (SEP) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com a solução metanólica 50% (v/v)

(concentração igual a 10 µg/mL). Por fim, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials.

4.7.3 Avaliação do Método

Uma solução contendo quantidades da solução amostra (1 mL) e solução do padrão (0,1 mL), foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, para confirmar a presença de alantoína na amostra. Ao final, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials.

4.7.4 Condições Cromatográficas

Os ensaios foram realizados em sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific[®], EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific[®]) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific[®]), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific[®]). As análises foram conduzidas com coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] (EUA) equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 µm; Phenomenex[®]). A fase móvel foi composta por água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga[®]) (solvente A) e acetonitrila grau HPLC (Tedia[®], Brasil) (solvente B). As análises foram realizadas com fluxo de fase móvel igual a 1,0 mL/min, segundo o gradiente: 0-5 min: 1%B, 5-10 min: 1-100%B, 10-15 min: 100%B e 15-20 min: 100-1%B. Os cromatogramas foram obtidos em temperatura igual a 25 °C; e com comprimento de onda igual a 210 nm e 350 nm.

4.7.5 Validação da Metodologia por CLAE

Linearidade do Padrão e da Amostra

A curva analítica da alantoína foi obtida com faixa de concentração entre 4,0-7,5 µg/mL, realizando as diluições a partir da solução estoque do padrão em metanol: água (1:1, v/v).

A curva analítica da amostra (confrei) foi obtida com diluições realizadas a partir da Solução Estoque da Amostra, com faixa de concentração entre 8,0-12,0

$\mu\text{g/mL}$. Foram injetados, separadamente, 20 μL das soluções da curva de linearidade da alantoína e da amostra, preparadas em triplicata e obtidos os cromatogramas. Ao final os cálculos das áreas dos picos e os resultados tratados estatisticamente com auxílio do Excel 2010 (Microsoft®).

Especificidade

A análise da curva de especificidade foram realizadas a partir da solução estoque da amostra, com faixa de concentração entre 8,0-12,0 $\mu\text{g/mL}$ e adicionada de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ do padrão. Foram injetados, separadamente, 20 μL das soluções da amostra e padrão. Ao final os cálculos das áreas dos picos e os resultados tratados estatisticamente com auxílio do Excel 2010 (Microsoft®).

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Na abordagem para os dados de LD e LQ foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média da alantoína para efetuar os cálculos e as equações conforme preconizadas pelo ICH (2005) e Anvisa (BRASIL, 2017).

Precisão - Repetibilidade e Precisão intermediária

Para a análise da repetibilidade foram preparadas 6 amostras independentes, conforme o procedimento da Solução Estoque, seguido de diluição apropriada para obter solução de concentração igual a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (100%). Na precisão intermediária, foram preparadas 3 amostras independentes (na concentração equivalente a 100%), por 2 operadores diferentes e em 2 dias diferentes. O teor foi calculado e expresso em g% de alantoína.

Exatidão

A partir da Solução Estoque obtida conforme descrito no item 4.5.1, foram realizadas diluições apropriadas e obtidas amostras de concentração correspondente a 100%. As amostras obtidas foram adicionadas quantidades conhecidas da solução padrão nas concentrações correspondentes a 80 a 120%

(4,00 a 6,00 $\mu\text{g/mL}$). Os cromatogramas foram registrados e as áreas dos picos foram medidas por integração. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação (%), de acordo com a equação da reta obtida para a curva de calibração da alantoína.

Robustez

Foram analisadas as amostras na concentração igual a 100% (10,0 $\mu\text{g/mL}$) submetidas a diferentes variações no procedimento usual. As mudanças realizadas foram: fluxo em nível baixo (0,900 mL/min) e alto (1,100 mL/min); temperatura do forno (24 °C e 26 °C); adição de ácido trifluoracético em ambas as fases móveis (concentração 0,05%). Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através das alterações nos tempos de retenção, teor e resolução do pico correspondente a alantoína.

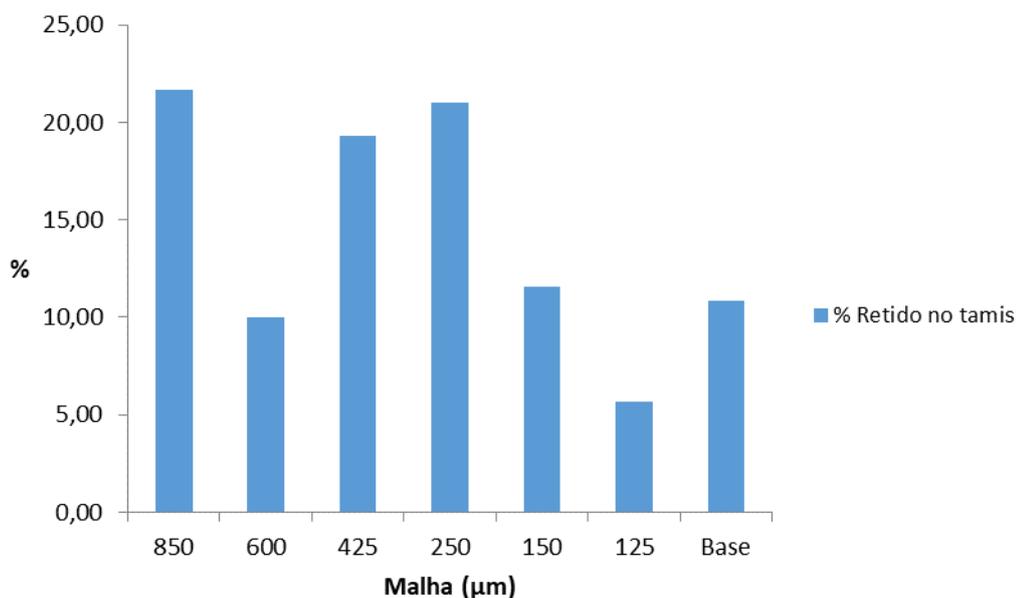
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 Análise Granulométrica

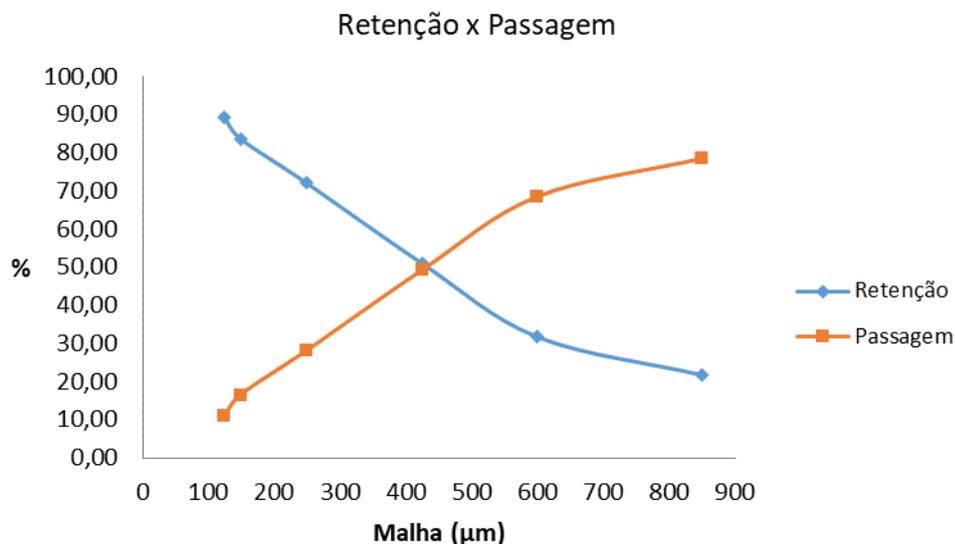
A avaliação granulométrica é um parâmetro de elevada importância a ser determinado, pois representa influência direta sobre a eficiência da extração. Após a realização dos processos de tamisação, os resultados observados nas figuras 3 e 4 mostram que o diâmetro médio foi de $433 \mu\text{m} \pm 34,00 \mu\text{m}$ para a amostra de folhas de *Symphytum officinale*, sendo a amostra considerada como pó grosso segundo a classificação da Farmacopeia Brasileira 5 Ed. (FB5, 2010), uma vez que as partículas obtidas não passaram em sua totalidade pela malha de $850 \mu\text{m}$.

Figura 3 - Distribuição granulométrica da amostra de folhas de *Symphytum officinale*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 4 - Curva de retenção e passagem da amostra de folhas de *Symphytum officinale*.



Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Material Estranho

A determinação de material estranho em drogas vegetais é um parâmetro que visa avaliar se a droga vegetal está livre de materiais estranhos como restos de insetos, fungos, mofo, impurezas de origem mineral, tecidos do mesmo vegetal sem atividade medicinal, partes contaminantes de outras plantas e outros materiais contaminantes, pois estes são fatores que diminuem o rendimento das drogas vegetais (SOARES; FARIAS, 2017). Através do resultado obtido no ensaio, a amostra cumpre a exigência legal não apresentando valor superior a 2% (m/m) de material estranho.

5.1.3 Perda por Dessecação

A avaliação da perda por dessecação do material vegetal visa quantificar os percentuais de umidade residual contidos na droga vegetal, sendo este parâmetro de grande importância para a garantia e preservação da autenticidade da matéria prima vegetal. Nesse sentido, uma elevada quantidade de água presente na droga vegetal poderá ocasionar a proliferação microbiana, aumento de reações químicas e enzimáticas, processos que resultam em mudanças químicas e bioquímicas nas matrizes vegetais, influenciando diretamente na qualidade do produto final (COUTO et

al., 2009; MARQUES et al., 2012; SOARES; FARIAS, 2017). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

5.1.4 Cinzas Totais

O teor de cinzas totais expressa a quantidade de substâncias obtidas por incineração que não são voláteis, estas, representam a soma do material inorgânico presentes na constituição da droga vegetal e materiais inorgânicos advindos do ambiente ou na etapa de processamento do material vegetal. A Farmacopeia Brasileira preconiza o limite máximo de 14% em diversas monografias oficiais (BRAGA et al., 2007; FB5, 2010; SOARES; FARIAS, 2017). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

5.1.5 Cinzas Insolúveis em Ácido

Como o resultado de cinzas totais foi superior a 8%, o ensaio de cinzas insolúveis em ácido foi realizado para a determinação de materiais silicosos na droga vegetal. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados dos ensaios físico-químicos realizadas para as folhas de *Symphytum officinale* (Perda por dessecação, Cinzas Totais e Cinzas Insolúveis em Ácido).

Ensaio	A1	A2	A3	Média ± DP (CV%)
Perda por dessecação (%)	9,66	9,59	10,09	9,78 ± 0,27 (0,79)
Cinzas Totais (%)	17,21	16,98	18,27	17,49 ± 0,68 (3,93)
Cinzas Insolúveis em Ácido (%)	3,36	3,55	3,47	3,46 ± 0,09 (2,76)

A: amostra; DP: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação.
Fonte: Autoria própria.

5.1.6 Determinação do pH do extrato

O pH do extrato etanólico de *S. officinale* foi de 6,46 correspondendo o valor aproximado constante na literatura de 6,5 (TOLEDO et al., 2003). Considerando o fato que o confrei pode apenas ser utilizado em preparações extemporâneas devido aos relatos de sua toxicidade, e sabendo que o pH ideal da pele em grande parte encontra-se entre 4,7 e 5,75, o valor de 6,5 encontrado aproxima-se do pH da água

pura, sendo considerado neutro. Os valores individuais, bem como o valor médio encontram-se na tabela 2.

5.1.7 Determinação da Densidade

O valor obtido para a densidade do extrato etanólico de *S. officinale* foi de 0,9241g/mL (Tabela 2).

5.1.8 Resíduo seco

O valor obtido para o resíduo seco do extrato etanólico de *S. officinale* foi de 0,5467% (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das análises de caracterização da Solução Extrativa obtida com etanol a 70% e à 85 °C da amostra de *Symphytum officinale*.

Ensaio	A1	A2	A3	Média ± DP (CV%)
pH	6,45	6,46	6,46	6,46 ± 0,0058 (0,09)
Densidade (g/mL)	0,9258	0,9236	0,9230	0,9241 ± 0,0015 (0,16)
Resíduo Seco (%)	0,57	0,55	0,52	0,5467 ± 0,0252(4,60)

A: amostra; DP: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

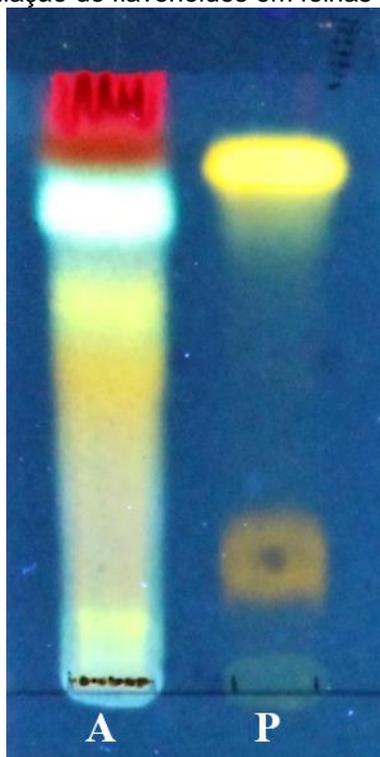
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A determinação de um perfil fitoquímico por CCD oferece um resultado rápido, útil e eficaz para o controle de qualidade de drogas vegetais visto que o conhecimento e avaliação dos constituintes químicos de uma espécie dispõem das informações de seus grupos metabólitos e conseqüentemente é útil para identificar as substâncias químicas complexas (ROCHA, 2014). Dessa forma, neste trabalho foi possível avaliar a presença de compostos do metabolismo secundário como taninos hidrolisáveis, derivados cinâmicos, alcaloides, flavonoides e saponinas.

Nas figuras 5 a 12 pode-se evidenciar os cromatogramas obtidos, entre os quais evidenciou-se a ausência para taninos condensados, cumarinas e terpenos/esteroides no extrato de *S. officinale*, uma vez que, a espécie não apresentou bandas de mesma coloração e mesmo Rf dos padrões utilizados.

No cromatograma obtido para evidenciar a classe de flavonoides, é possível observar na amostra bandas de coloração amarela após derivatização com NEU+PEG, indicativo da presença do metabólito (Figura 5). A quercetina tanto na amostra como no padrão apresentou Rf de 0,8 e a rutina Rf de 0,3.

Figura 5 - Cromatograma para avaliação de flavonoides em folhas de *S. officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (quercetina e rutina).
Fonte: Autoria própria.

Após derivatização com vanilina clorídrica é possível observar que o padrão catequina apresenta coloração rósea-avermelhada com Rf de 0,75. A amostra não apresentou nenhuma banda característica e indicativa da presença de taninos condensados (Figura 6). Já em relação aos polifenóis, após derivatizar com cloreto férrico, o aparecimento de bandas de coloração azul-acinzentadas é indicativo da presença dos mesmos, devido a presença de hidroxilas fenólicas (Figura 7), apresentando Rf de 0,78. Resultado negativo também foi observado em relação a presença de terpenos/esteroides (Figura 8) em que o padrão apresentou Rf de 0,6 e cumarinas (Figura 9) em que o padrão foi observado com Rf (0,7).

Figura 6 - Cromatograma para avaliação de taninos condensados em folhas de *S. officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (catequina).
Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Cromatograma para avaliação de taninos hidrolisáveis em folhas de *S. officinale*.



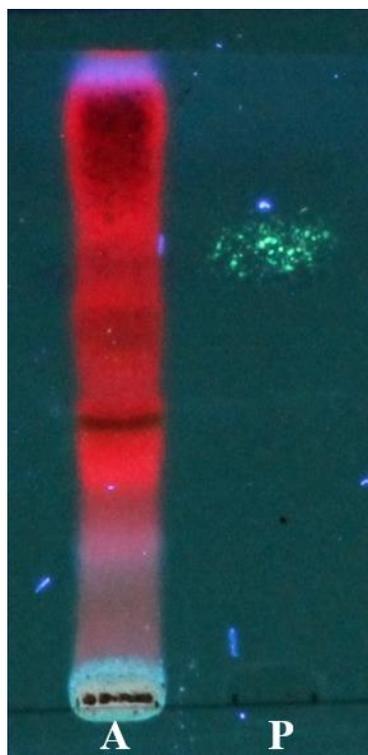
A: Amostra; P: Padrão (ácido gálico).
Fonte: Autoria própria.

Figura 8 - Cromatograma para avaliação de terpenos esteroides em folhas de *S. officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (β - sitosterol)
Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Cromatograma para avaliação de de cumarinas em folhas de *S. officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (cumarina).
Fonte: Autoria própria.

Quanto a presença de derivados cinâmicos, a amostra apresentou bandas de coloração azulada, indicativo da classe após derivatização com NEU+PEG (Figura 10) em que podemos observar o padrão e a amostra de ácido caféico com Rf de 0,85 e o ácido clorogênico com Rf de 0,35. Já em relação as saponinas, foram evidenciadas bandas verde-amarronzadas indicando um resultado positivo para a referida classe (Figura 11) com Rf de 0,73.

Figura 10 - Cromatograma para avaliação derivados cinâmicos em folhas de *S. officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (ácido cafeico e ácido clorogênico).
Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Cromatograma para avaliação de saponinas em folhas de *S.officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (escina).
Fonte: Autoria própria.

Por fim, a avaliação da presença de alantoína, foco do estudo, nas folhas de *S. officinale*, demonstrou um resultado positivo. No cromatograma (Figura 12), é possível observar a presença de alantoína no extrato devido a banda de coloração amarela, com mesmo valor de Rf (0,35) correspondente ao valor do Rf (0,35) do padrão alantoína.

Figura 12 - Cromatograma para avaliação da alantoína em folhas de *S.officinale*.



A: Amostra; P: Padrão (alantoína).
Fonte: Autoria própria.

5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E TEMPERATURA DE OBTENÇÃO DO EXTRATO

Os resultados obtidos foram avaliados considerando-se a concentração de etanol e da temperatura. Os dados foram plotados e estão dispostos na matriz da tabela 3, evidenciando as variáveis codificadas e naturais, bem como o teor de alantoína obtido nas determinações.

Tabela 3 – Matriz do desenho experimental para otimização do método de quantificação de alantoína em folhas de *S. officinale*.

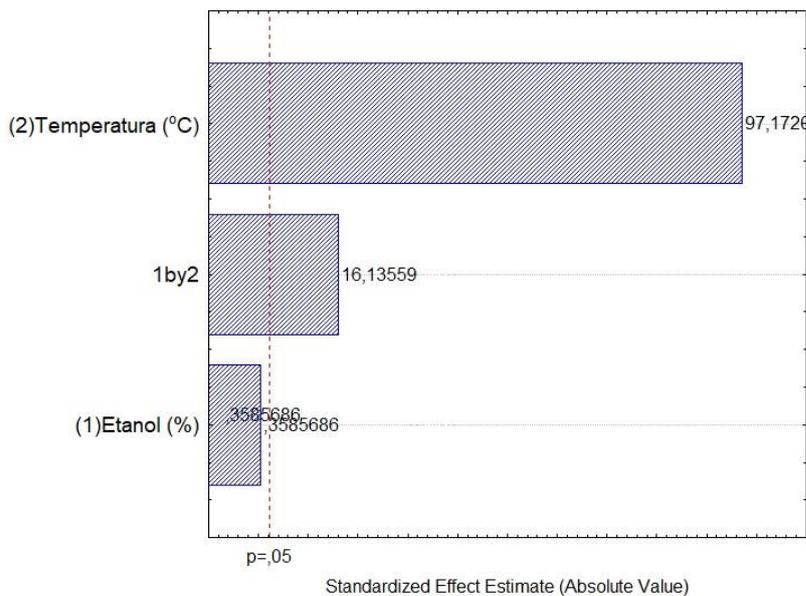
Variáveis Codificadas		Variáveis naturais		Resposta
Etanol (%)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Teor de Alantoína
-1,00000	-1,00000	50	50	1,60
-1,00000	1,00000	50	85	2,08
1,00000	-1,00000	70	50	1,51
1,00000	1,00000	70	85	2,17
-1,00000	-1,00000	50	50	1,60
-1,00000	1,00000	50	85	2,07
1,00000	-1,00000	70	50	1,51
1,00000	1,00000	70	85	2,19
-1,00000	-1,00000	50	50	1,60
-1,00000	1,00000	50	85	2,07
1,00000	-1,00000	70	50	1,51
1,00000	1,00000	70	85	2,15

Fonte: Autoria própria.

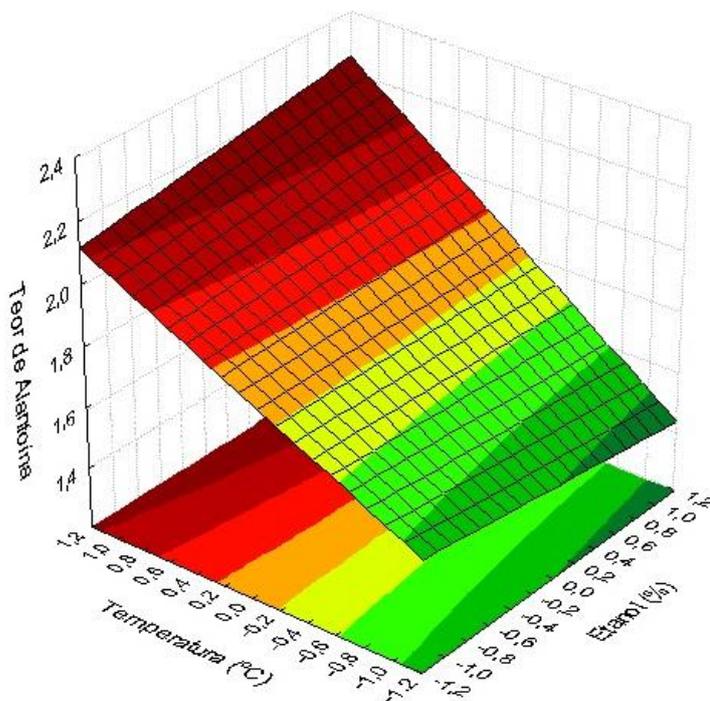
De acordo com o Gráfico de Paretos (figura 13 A), é possível evidenciar que a variável temperatura é um fator importante no aumento do teor de alantoína, apresentando influência positiva e significativa sobre a resposta do método (+97,17); enquanto que, a concentração de etanol não apresenta influência significativa. Além disso, a interação entre as duas variáveis apresentou influência positiva e significativa (+16,13). Considerando a avaliação da superfície de resposta (Figura 13B), evidencia-se os resultados de influência positiva quando ambas as variáveis estão no valor máximo, ou seja, quando se aumenta a concentração de etanol e a temperatura de extração, ocorre maior extração de alantoína. Dessa forma, evidencia-se que o

melhor resultado foi obtido utilizando-se a concentração de etanol a 70% (v/v) e temperatura de extração a 85 °C. Os teores de alantoína foram calculados com base na curva de calibração obtida para o padrão (resultados descritos em validação do método), por conseguinte as demais análises foram realizadas utilizando tais parâmetros.

Figura 13 – Gráfico de Paretos (A) e Superfície de Resposta (B) obtidos para a avaliação do teor de alantoína frente as diferentes condições de etanol (%) e temperatura (°C).



A



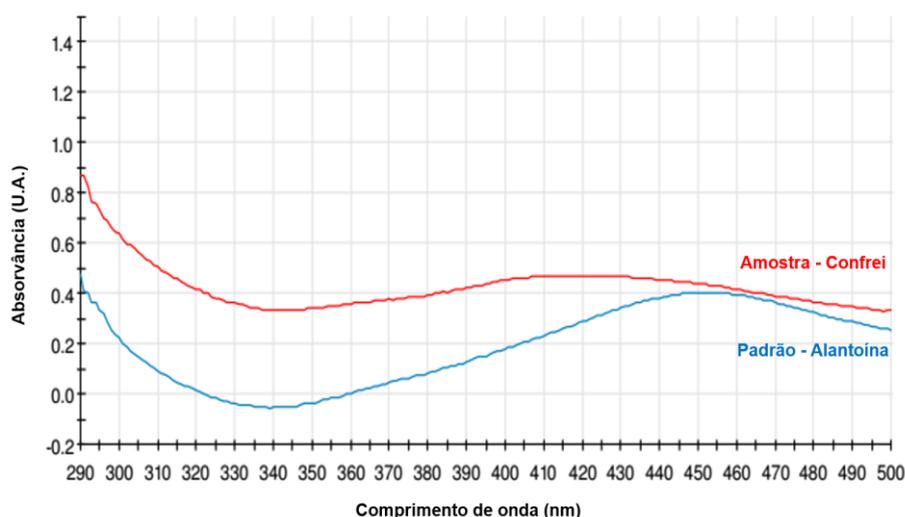
B

Fonte: Autoria própria.

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE ALANTOÍNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

De acordo com a análise preliminar realizada para verificar a presença de alantoína no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. officinale*, foi realizada uma varredura espectrofotométrica na faixa de 290 a 500 nm, do extrato e do padrão (alantoína). É possível observar que após a reação com o reativo 2,4 – dinitrofenilhidrazina seguido de aquecimento e basificação, o máximo de absorção ocorre em 450 nm (Figura 14), tornando possível o seguimento das análises.

Figura 14 - Espectro de varredura da amostra (confrei) e padrão (alantoína).



Fonte: Autoria própria.

5.4.1 Validação

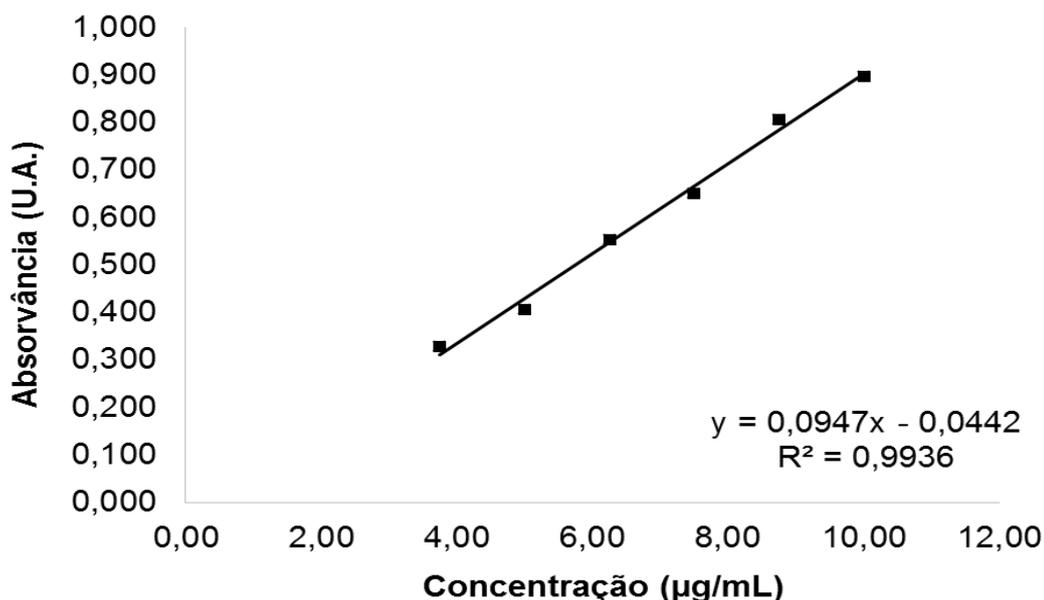
Linearidade

Em relação à análise de linearidade, a tabela 4 e a figura 15 mostram os resultados de absorvância da curva de calibração do padrão de alantoína e a curva de calibração média obtida da solução de alantoína. A equação da reta obtida pela regressão linear, assim como os coeficientes de correlação para as soluções do padrão foi igual a $y = 0,0947x - 0,0442$, $R^2 = 0,9936$.

Tabela 4 - Resultados de absorvância obtidos para a curva de calibração do padrão de Alantoína.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DP	CV%
3,75	0,330	0,329	0,324	0,328	0,0032	0,98
5,00	0,426	0,403	0,392	0,407	0,0173	4,26
6,25	0,569	0,548	0,541	0,553	0,0146	2,64
7,50	0,650	0,643	0,655	0,649	0,0060	0,93
8,75	0,824	0,806	0,788	0,806	0,0180	2,23
10,00	0,900	0,899	0,893	0,897	0,0038	0,42

$\mu\text{g/mL}$: miligrama por mililitro, Abs: absorvância, DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.
Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Curva de calibração média obtida do padrão de Alantoína.

Fonte: Autoria própria.

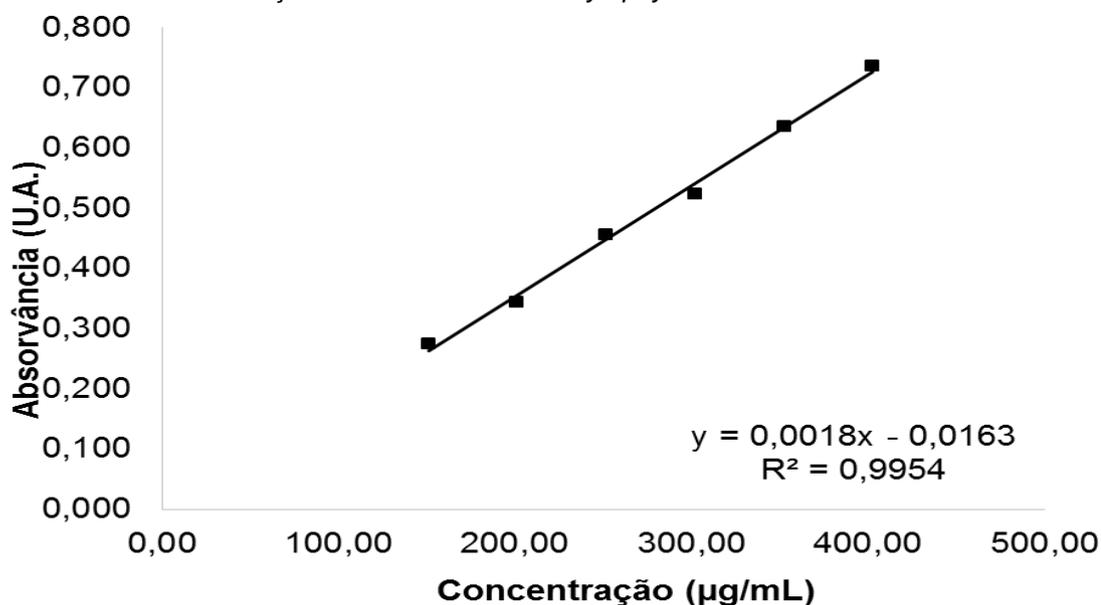
Em relação à análise de linearidade, a tabela 5 e a figura 16 mostram os resultados de absorvância da curva de calibração do extrato das folhas de *S. officinale* (confrei) e a curva de calibração média obtida do respectivo extrato. A equação da reta obtida pela regressão linear, assim como os coeficientes de correlação para as soluções do extrato foi igual a $y = 0,018x - 0,0163$, $R^2 = 0,9954$.

Tabela 5 - Resultados de absorvância obtidos para a curva de calibração do extrato das folhas de *Symphytum officinale* a 70% e 85 °C.

Concentração(µg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DP	CV%
150,99	0,282	0,265	0,275	0,271	0,0140	3,18
201,32	0,346	0,342	0,345	0,344	0,0021	0,60
251,65	0,461	0,451	0,454	0,455	0,0051	1,13
301,98	0,520	0,534	0,517	0,524	0,0091	1,73
352,31	0,624	0,639	0,642	0,635	0,0096	1,52
402,64	0,739	0,734	0,736	0,736	0,0025	0,34

µg/mL: miligrama por mililitro, Abs: absorvância, DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.
Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Curva de calibração média do extrato de *Symphytum officinale* a 70% e 85 °C.



Fonte: Autoria própria.

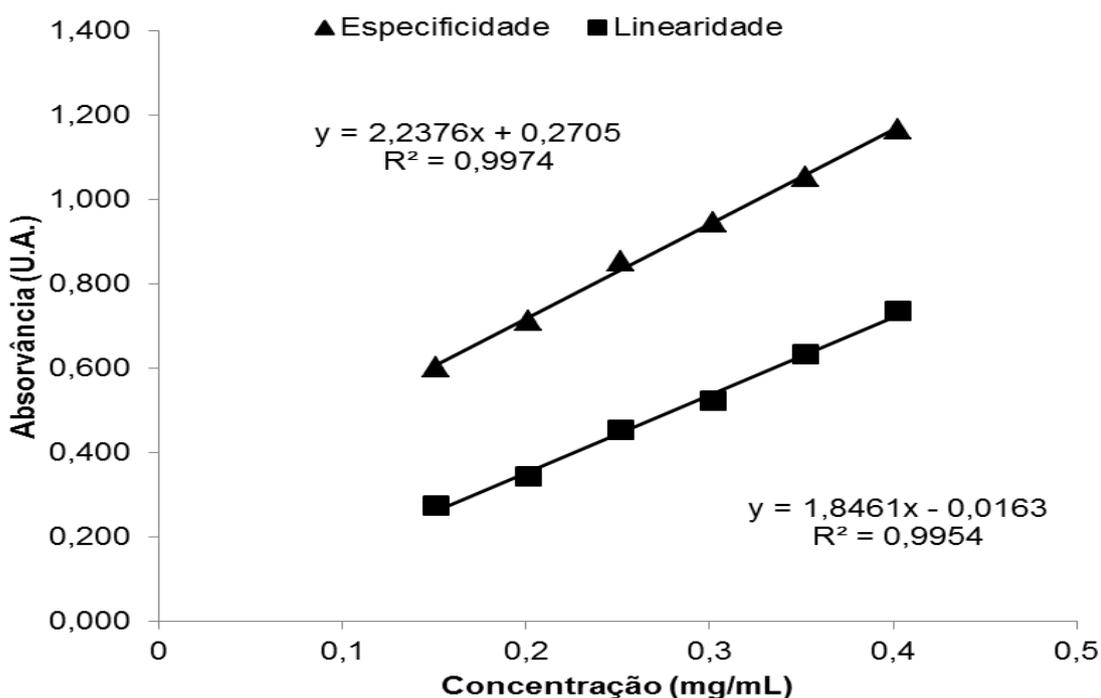
Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da curva de calibração do padrão, sendo encontrados valores de LD igual a 0,011 µg/mL e LQ igual a 0,036 µg/mL, respectivamente. Dessa forma, é possível evidenciar que o método apresentado possui sensibilidade para detecção e quantificação de alantoína em folhas de confrei.

Especificidade

A figura 17 mostra a curva média obtida para a solução amostra das folhas de *S. officinale* (curva de linearidade) e para a solução da mesma enriquecida com o padrão de alantoína (curva de especificidade). De acordo com a análise das curvas de linearidade e especificidade pode-se observar que as mesmas se mostraram paralelas, comprovando desse modo a especificidade do método.

Figura 17 - Curvas de linearidade e especificidade médias obtidas para a amostra (confrei) e amostra+padrão por Espectrofotometria.



Fonte: Autoria própria

Precisão

O método foi preciso nos dois níveis analisados: repetibilidade e precisão intermediária. Em relação ao parâmetro repetibilidade nas soluções amostras o teor médio de alantoína foi de 1,92g%, com coeficiente de variação igual 1,31%. No ensaio de precisão intermediária (Tabela 6), realizado por 2 analistas no mesmo dia e em dias diferentes, também foi possível verificar baixos valores de coeficiente de variação. Como resultado do Op1D1D2 a média apresentou o valor de 1,95 ±0,0658(3,38%) e o Op2D1D2 a média foi de 1,97±0,0285(1,44%).

Tabela 6 - Resultados de teor, calculados para o ensaio de precisão por Espectrofotometria.

Amostras	Op1D1	Op2D1	Op1D2	Op2D2
1	1,84	2,00	2,00	1,95
2	1,93	2,00	2,01	1,94
3	1,93	1,99	2,01	1,94
Média	1,899	1,995	2,005	1,945
DP	0,0515	0,0082	0,0015	0,0082
CV (%)	2,71	0,41	0,08	0,42

Op: Operador; D: Dia; DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

Exatidão

A tabela 7 mostra os resultados do ensaio de exatidão após a contaminação das soluções amostras de concentração fixa (251,65 µg/mL) com soluções de concentrações conhecidas dos padrões de alantoína (3,75 a 10,0 µg/mL). Os valores experimentais de concentração foram comparados com as concentrações teóricas, utilizando como base para os cálculos a equação da reta da alantoína. Os valores de recuperação ficaram entre 98,28 a 113,70%, cuja média foi de 105,31%.

Tabela 7 - Resultados obtidos no teste de recuperação para alantoína na solução amostra de folhas de *S. officinale*.

Amostras	Exatidão (%)		
	80	100	120
1	116,16	96,86	104,27
2	116,88	97,54	103,71
3	108,08	100,45	103,87
Média	113,705	98,281	103,951
DP	4,8885	1,9044	0,2869
CV%	4,30	1,94	0,28

DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

Robustez

Segundo a legislação RDC 166/17, para que o método seja considerado robusto durante a validação de um método analítico, é necessário que ele resista a pequenas e deliberadas modificações, não apresentando valores de coeficiente de

variação superiores a 5% (BRASIL, 2017). Como pode ser observado na tabela 8, as modificações realizadas na metodologia não apresentaram grandes diferenças nos teores calculados e dessa forma, as mudanças realizadas não atribuíram alterações significativas ao método. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (desvio padrão relativo %).

Tabela 8 - Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas de *S. officinale*.

Parâmetro	Modificação	Teor de Alantoína
Luminosidade	Ausência de Luz	2,08 \pm 0,0379 (1,81)
	Presença de Luz	1,94 \pm 0,0153 (0,79)
Espectrofotômetro	Equipamento 01	1,90 \pm 0,0520 (2,73)
	Equipamento 02	1,93 \pm 0,0158 (0,82)
Tempo de Leitura	05 minutos	2,00 \pm 0,0061 (0,30)
	10 minutos	1,90 \pm 0,0520 (2,73)

Resultados expressos como: média em g% (gramas por cento) \pm desvio padrão (coeficiente de variação percentual).

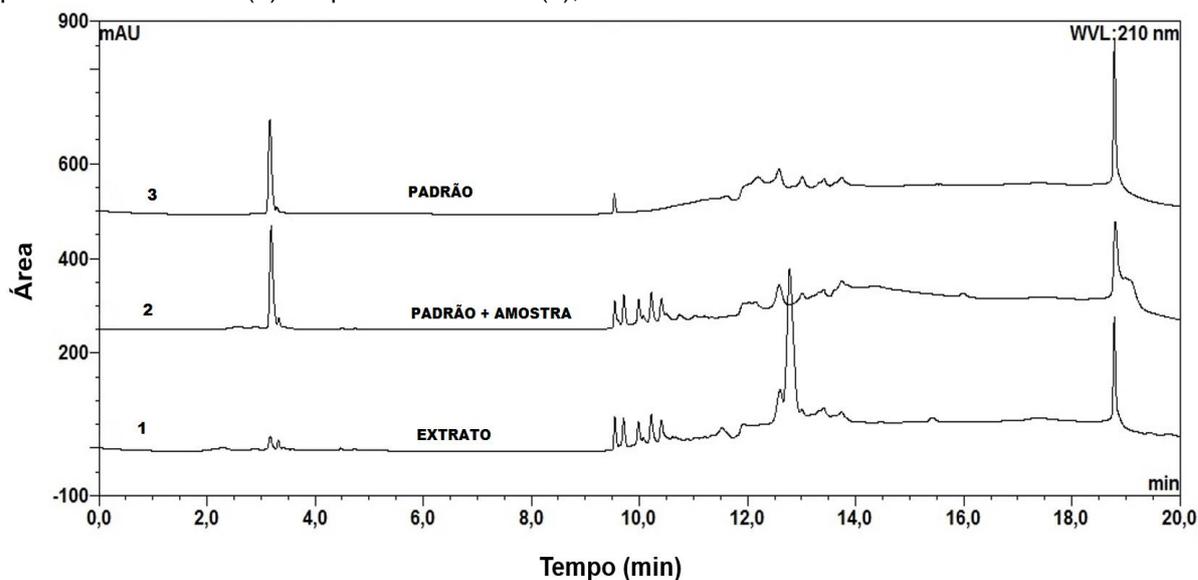
Fonte: Autoria própria.

5.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE ALANTOÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

5.5.1 Avaliação do Método

De acordo com a análise preliminar realizada para detectar e quantificar alantoína no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. officinale*, foi possível observar o pico correspondente a presença de alantoína em aproximadamente 3,20 min. A figura 18 traz os cromatogramas referentes ao extrato de *S. officinale* (1), extrato de *S. officinale* fortificado com o padrão de alantoína (2) e o padrão alantoína (3). Dessa forma foi possível confirmar a presença de alantoína na amostra, pela co-injeção do padrão com a amostra, resultando em aumento de área e pelo tempo de retenção do pico correspondente.

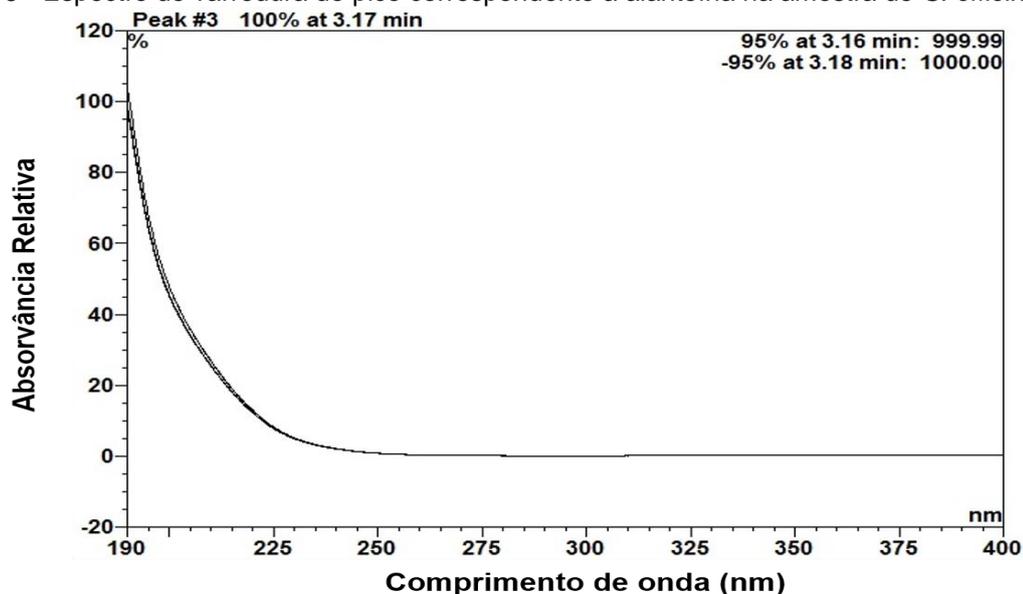
Figura 18 - Cromatogramas do extrato de *S. officinale* (1), extrato de *S. officinale* fortificado com o padrão de alantoína (2) e o padrão alantoína (3), evidenciados em 210 nm.



Fonte: Autoria própria.

Além disso, foi realizada a varredura do pico correspondente a alantoína na amostra para evidenciar possíveis desvios de comprimento de onda. De acordo com o espectro de varredura do pico que apresentou tempo de retenção em aproximadamente 3,20 minutos, foi possível observar o espectro da figura 19.

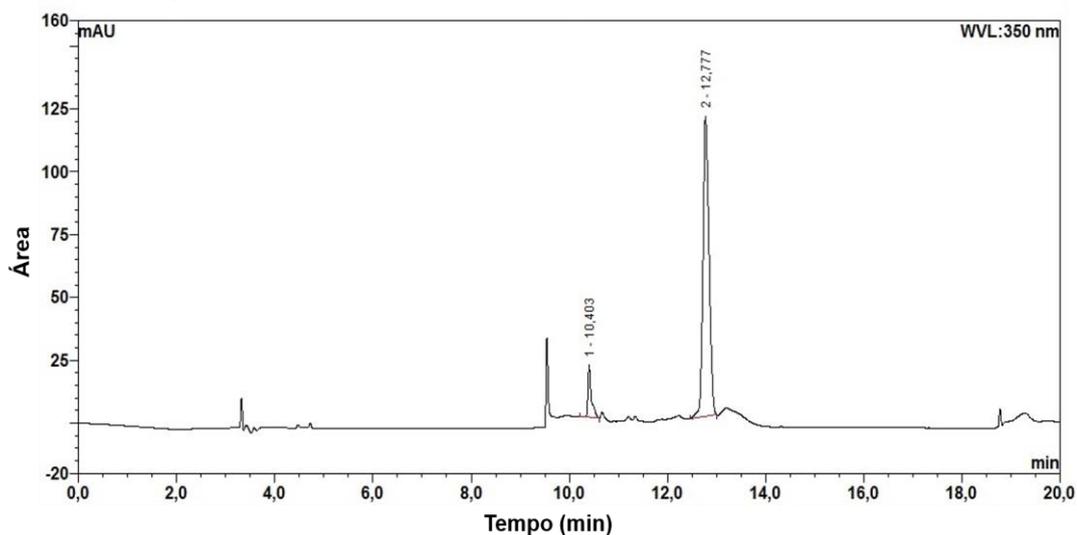
Figura 19 - Espectro de varredura do pico correspondente a alantoína na amostra de *S. officinale*.



Fonte: Autoria própria.

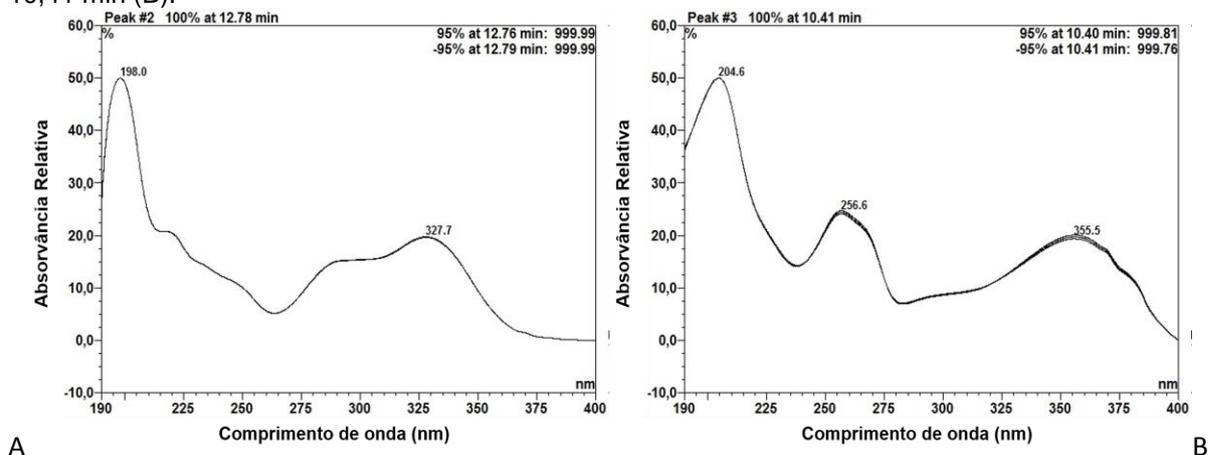
Como o extrato também foi monitorado em 350 nm (Figura 20), foram observados dois picos com características pertencentes a classe de flavonoides. O primeiro, em 10,41 min, apresentou máximos de absorção em 204.6/256.6/355.5; e, o segundo em 12,78 min com máximos em 198.0/327.7 (Figuras 21a e 21b).

Figura 20 - Cromatograma do extrato de *S. officinale* evidenciado em 350 nm.



Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Espectro de varredura dos picos evidenciados em 350 nm. Pico em 12,78 min (A) e em 10,41 min (B).



Fonte: Autoria própria.

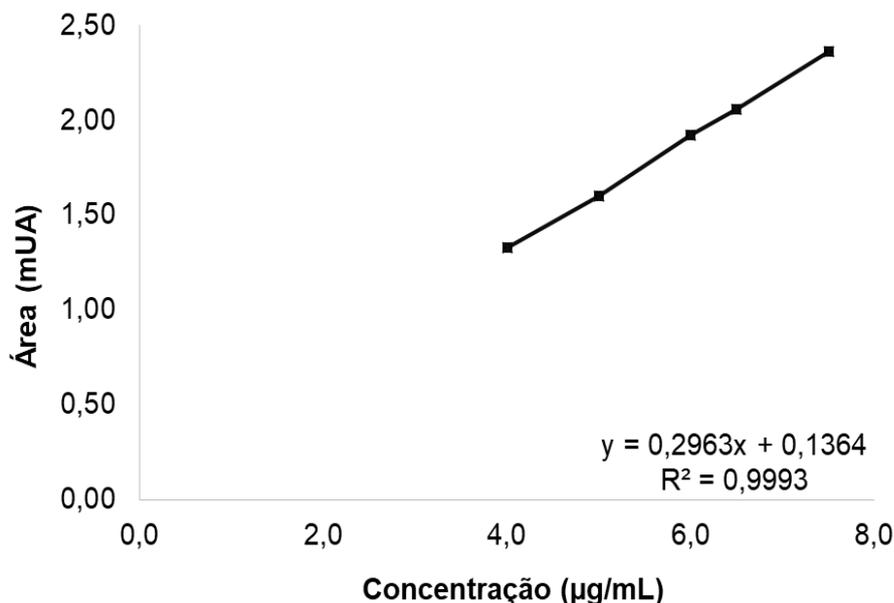
5.5.2 Validação

Linearidade

Em relação à análise de linearidade, as figuras 22 e 23 mostram as curvas de calibração média obtida das soluções de alantoína e da amostra (confrei). As

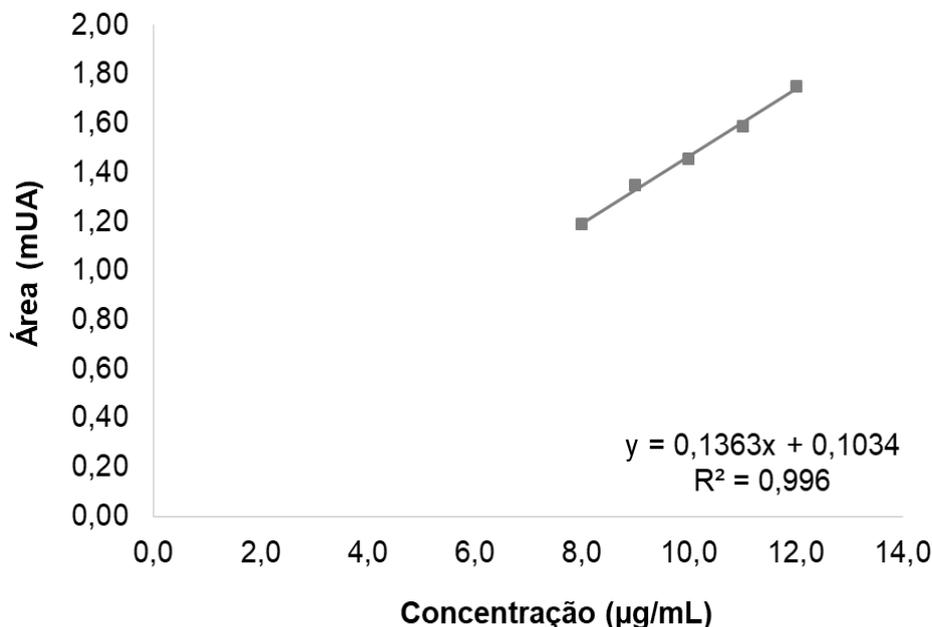
equações da reta obtida pela regressão linear, assim como os coeficientes de correlação para as soluções do padrão foi igual a $y = 0,2963x + 0,1364$, $R^2 = 0,9993$; e, da amostra $y = 0,1363x + 0,1034$, $R^2 = 0,996$.

Figura 22 - Curva de linearidade média obtida para o padrão (alantoína) por CLAE.



Fonte: Autoria própria.

Figura 23 - Curva de linearidade média obtida para a amostra (confrei) por CLAE.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados obtidos é possível comprovar uma relação satisfatória entre as concentrações do analito e suas respectivas áreas dos picos, de modo a atender aos requisitos preconizados pela legislação em vigor para análise desse parâmetro ($R^2 > 0,99$) (BRASIL, 2017).

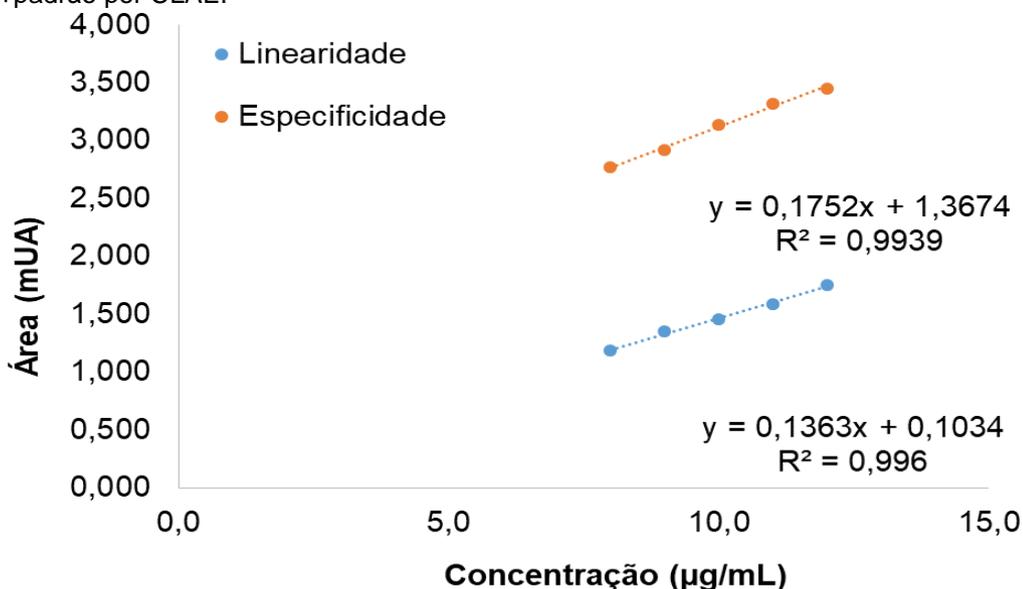
Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da curva de calibração do padrão, sendo encontrados valores de LD igual a 0,04 µg/mL e LQ igual a 0,16 µg/mL, respectivamente. Dessa forma, é possível evidenciar que o método apresentado possui sensibilidade para detecção e quantificação de alantoína em folhas de confrei.

Especificidade

A figura 24 mostra a curva média obtida para a solução amostra das folhas de *S. officinale* (curva de linearidade) e para a solução da mesma enriquecida com o padrão de alantoína (curva de especificidade). De acordo com a análise das curvas de linearidade e especificidade pode-se observar que as mesmas se mostraram paralelas, comprovando desse modo a especificidade do método.

Figura 24 - Curvas de linearidade e especificidade médias obtidas para a amostra (confrei) e amostra+padrão por CLAE.



Fonte: Autoria própria.

Precisão

O método foi preciso nos dois níveis analisados: repetibilidade e precisão intermediária. Em relação ao parâmetro repetibilidade nas soluções amostras o teor médio de alantoína foi de 0,22g%, com coeficiente de variação igual 3,89%. No

ensaio de precisão intermediária (Tabela 9), realizado por 2 analistas no mesmo dia e em dias diferentes, também foi possível verificar baixos valores de coeficiente de variação. Como resultado do Op1D1D2 a média apresentou o valor de 0,217 \pm 0,0035(1,61%) e o Op2D1D2 a média foi de 0,214 \pm 0,0063(2,94%).

Tabela 9 - Resultados de teor, calculados para o ensaio de precisão por CLAE.

Amostras	Op1D1	Op2D1	Op1D2	Op2D2
1	0,22	0,23	0,21	0,21
2	0,21	0,22	0,22	0,21
3	0,21	0,21	0,22	0,21
Média	0,22	0,22	0,22	0,21
DP	0,0050	0,0081	0,0018	0,0006
CV (%)	2,28	3,73	0,84	0,29

Op: Operador; D: Dia; DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

Exatidão

A tabela 10 mostra os resultados do ensaio de exatidão após a contaminação das soluções amostras de concentração fixa (10 μ g/mL) com soluções de concentrações conhecidas dos padrões de alantoína (4,0 a 6,0 μ g/mL). Os valores experimentais de concentração foram comparados com as concentrações teóricas, utilizando como base para os cálculos a equação da reta da alantoína. Os valores de recuperação ficaram entre 96,52 a 102,37%, cuja média foi de 99,87%.

Tabela 10 - Resultados obtidos no teste de recuperação para alantoína na solução amostra de folhas de *S. officinale*.

Amostras	Exatidão (%)		
	80	100	120
1	101,74	96,70	101,68
2	103,84	95,91	101,59
3	101,55	96,95	98,92
Média	102,375	96,521	100,728
DP	1,2681	0,5454	1,5685
CV%	1,24	0,57	1,56

DP: desvio padrão, CV%: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

Robustez

Segundo a legislação (RDC 166/17) para que o método seja considerado robusto durante a validação de um método analítico, é necessário que ele resista a pequenas e deliberadas modificações, não apresentando valores de coeficiente de variação superiores a 5% (BRASIL, 2017). Durante o desenvolvimento do método foram realizadas algumas modificações de parâmetros considerados críticos, sendo eles: temperatura da coluna; fluxo de fase móvel e acidificação das fases móveis. A tabela 11 traz os resultados obtidos dos teores para as variações de fluxo de fase móvel e temperatura da coluna, evidenciando valores menores que 3,24% em relação ao coeficiente de variação. Entretanto, ao realizar a acidificação das fases móveis, seja isoladamente ou em conjunto, foi possível evidenciar que o pico correspondente a alantoína não apresentava simetria. Dessa forma, optou-se por permanecer com as fases móveis (água ultrapura e acetonitrila) sem adição de ácidos.

Tabela 11 - Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas de *S. officinale*.

Parâmetro	Variáveis	Teor de Alantoína
Fluxo (mL/min)	0,900	0,21 ± 0,0068 (3,24)
	1,100	0,21 ± 0,0062 (2,95)
T (°C)	24	0,21 ± 0,0039 (1,78)
	26	0,21 ± 0,0025 (1,17)

Resultados expressos como: média em g% (gramas por cento) ± desvio padrão (coeficiente de variação percentual).

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

A caracterização físico-química contribuiu para a obtenção de parâmetros de qualidade para a droga estudada e os resultados obtidos fornecem dados comparativos de qualidade para estudos posteriores com a espécie.

A prospecção fitoquímica das folhas da espécie mostrou a presença de alcaloide (alantoína) objeto desse estudo, derivados cinâmicos, flavonoides, saponinas e taninos hidrolisáveis.

Através do estudo de otimização do método analítico espectrofotométrico no visível e do método por cromatografia a líquido de alta eficiência aplicado as folhas de *Symphytum officinale* L., foi possível avaliar e quantificar o teor de alantoína presente na droga vegetal. Dessa forma, a aplicação de ambos os métodos deverá garantir a qualidade da alantoína presente na droga vegetal de *Symphytum officinale* L. (confrei).

Por fim, a validação dos métodos de doseamento por espectrofotometria no UV-VIS e por CLAE mostrou a adequabilidade para a finalidade proposta, apresentando-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

REFERÊNCIAS

- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, K. **Enciclopédia de plantas brasileiras**. São Paulo: três, p. 988.300, 1988.
- ARAÚJO, L.U.; REIS, P. G.; BARBOSA, L. C. O.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; Grabe-Guimarães, A.; Mosqueira, V. C. F.; CARNEIRO, C.M. ; SILVA-BARCELLOS, N. M. In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. **Pharmazie** 67: 355-360, 2012.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para Saúde**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun., 2014.
- ASSONUMA, Murilo Massão. Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de cordia ecalyculata vell. (chá de bugre). **Revista de Farmácia UNESP**, Araraquara, v. 3, n. 14, p. 82-100, jan./dez. 2009.
- BARNI, S. T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-70, 2009.
- BERINGER, P. (Ed.) **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19th ed. Easton: Mack, p. 880, 1995.
- BIAVATTI, M. W.; MIRANDA, R. P. Alcalóides pirrolizidínicos. In: SIMÕES, C.M.O.(Org) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, cap. 25, p. 389 - 402, 2017.
- BILLABERT, A.; WILLEMOT, J.; PARRY, G. Dosage de l'allantoïne dans des produits pharmaceutiques. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 34, n. 1, p. 65- 66, 1976.
- BORCHERS, R. Allantoin determination. **Analytical Biochemistry**, 79(1), 612-613, 1977.
- BORBA, P. A. A.; RIEKES, M. K.; PEREIRA, R. N.; STULZER, H.K.; VECCHIA, D. D. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quim. Nova**, v. 36, n. 4, p. 582-586, 2013.
- BRAGA, R.R.; SALESA, J.; MARINSB, R.C.E.E.; ORTIZC, G.M.D.; GARCIA, S.; Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A** 91,389-394, 2012.
- BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *Verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas da COFID** (Versão V), 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 25 de julho de 2017. Brasília, DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed., Brasília, v.1, p.86-198, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 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**, 14 de maio de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). [on line]. Portaria n. 19, de 30 de janeiro de 1992. [acesso 2007 set 20]. Disponível em: <http://200.214.130.38/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=156&sit=0&assunto=&qtd=10&ti_po_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Dispõe sobre Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. Brasília: Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, 2006a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, 2006b.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portal Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>> Acesso em : 02 de jul 2017.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129 146, jan/dez, 2003.

BRUNEL, A.; CAPELLE, G. Sur l'importance biologique des ureides glyoxyliques chez les etres vivants. I. L'allantoine et l'acide allantoique chez les vegetaux. **Bulletin Société Chimique et Biologie**, v. 29, p. 427-444, 1947.

CARVALHO JCT. **Fitoterápicos antiinflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd; 2004.

CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

COUTO R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* de. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 196, p. 177-91, 2009.

CHAVES, MGAM. Efeito do medicamento homeopático (*Symphytum officinallis* 6CH) e do osso bovino granulado na reparação óssea em tibia de ratos: estudo histomorfométrico [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2003.

CHEN, X.B.; MATSUZEWSKI, W.; KOWALCZYK, J. Determination of allantoin in biological, cosmetic and pharmaceutical samples. **J.AOC Int.** v. 79, n. 3,. p. 628-35, may-jun. 1996.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5.ed. Rio de Janeiro: Bertrand, p.289-290,1995.

D'ANCHISE, R.;BULITTA, M.; GIANNETTI, B. Comfrey extract ointment in comparison to a diclofenac gel in the treatment of acute unilateral ankle sprains (distortions). **Arzneim-Forsch Drug Res.** v. 57, p. 712–716, 2007

DENNIS, R.; DEZELAK, C.; GRIME, J. Studies on symphytum species-HPLC determination of allantoin. **Acta Pharm Hung.**, v. 57, n.6, p.267-74, 1987.

DIAS, T.G. Estudo farmacognóstico de Porangaba(*Cordia ecaliculata* Vell. Boraginaceae) e identificação de suas alterações. Dissertação de mestrado em Fármaco e Medicamentos- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. p.107, 2004.

DUARTE, F. R. Influência de dois tipos de solos sobre o teor total de alcaloides do confrei. Piracicaba, 1984, 84p. Dissertação de Mestrado, 1984.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMOES, C.M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p.199-222, 2001.

FERRARI, R.; BARBOSA, A. C. L.; BARBOSA, A. M.; ARCHONDO, M. R.D.; ORNELAS, S.S. Géis formulados com extrato de confrei (*S. officinale* L.) para o tratamento de queimadura. **Anuário da produção acadêmica docente**. V.6, n.16, p.149-155, 2012.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. 6. ed. Barcelona: Labor, p.549-550. 1980.

FU, Y.C., FERNG, L.H.A., HUANG, P.Y. Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bubil of Dioscorea species. **Food Chemistry**, 94: 541- 549, 2006.

FROST, R.; MACPHERSON, H.; O'MEARA, S. Uma revisão crítica do alcance de usos externos de consuelda (*Symphytum* spp.). **Terapias Complementares em Medicina**, 21 (6): 724 - 745, 2013.

GAO, X.H.; ZHANG, L.; WEI, H.; CHEN, H.D. Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, 26: 367- 374, 2008.

GAEDCKE, F.; STEINHOFF, B. wissenschaftliche und rechtliche Grundlagen für Entwicklung, Standardisierung und Zulassung in Deutschland und Europa. Stuttgart: WVG, **Phytopharmaka**, 2000.

GOLDMAN, R.S.; FREITAS, P.C.D.; OGA, S. Wound healing and analgesic effect of crude extracts of *Symphytum officinale* in Rats. **Fitoterapia**, 56(6): 323-9. 1985.

HAGHI, G., ARSHI, R., SAFAEI, A. Improved High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Quantitative Analysis of Allantoin in *Zea mays*. **J. Agric. Food and Chem**, 56: 1205 -1209, 2008.

ICH. International Conference on Harmonisation Q2 (R1). 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. [cited 2008 nov 20]. Available from: <http://www.ich.org>.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P.; Fitoterápicos: um Mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

LIMA, AP. Efeito do *Symphytum officinale* L. (confrei) fitoterápico e homeopático na reparação óssea em tíbias de ratos [tese]. São José dos Campos, UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2012.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; COUTO E SILVA, A. Revisão sistemática sobre a produção científica de plantas medicinais da Rénisus voltadas ao Diabetes Mellitus. **Caderno pedagógico**, Lajeado. v. 12, n. 1, p. 87-99, 2015.

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M., LEÃO; W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; NETO, P. J. R. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MARQUES, G. S., MONTEIRO, R. P. M., LEÃO, W. F., LYRA, M. A. M., PEIXOTO, M. S., ROLIM-NETO, P. J., XAVIER, H. S., SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, L. C.; PETROVICK, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, Cap. 14, p. 327-370, 2010.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetada para pequenas comunidades, 2ª ed., Fortaleza: UFC, p.180,1994.

MECCA, S. B. New allantoin derivatives for cosmetic and dermatological application. **American Perfumer & Cosmetics**, v. 86, n. 5, p. 39-42, 1971.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; WIDDOP, B.; GREENFIELD, E. S.; CLARKE, E. G. S. (Ed.) Clarke's isolation and identification of drugs in

pharmaceuticals, body fluids, and post mortem materials. 2nd ed. London: **Pharmaceutical Press**, p.1223, 1978.

MONTEIRO, R.P.M. Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale*. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFPE, 2016.

O'NEIL, M.J. **The Merck Index**: an encyclopedia of chemical, drugs and biological. 15th ed. Whitehouse Station: Merck, 2013.

PILEGGI, M.; RAIMAM, P.M.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V., Ação antimicrobiana e interação endofilica em *Symphytum Officinale* L. **Biological and Health Sciences**, v.8, n.1, p. 47-55, 2002.

POZZETI, GL. *Symphytum officinale*, sua toxicologia e a respectiva patogenia registrada na literatura homeopática. **Pesq Homeop.**;6(1): 29-33, 1991.

PREDEL, H.G.; GIANNETTI, B.; KOLL, R.; BULITTA, M.; STAIGER, C. Efficacy of a comfrey root extract ointment in comparison to a diclofenac gel in the treatment of ankle distortions: results of an observer-blind, randomized, multicenter study. **Phytomedicine**, v. 12, n.10, p.707-14, 2005.

RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; BLESSA, E. P.; IWABE, S.; CROCI, A.J. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas em ratos. **Ciência Rural**, v.31, n. 6, p. 1007-1011, 2001.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, E. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

REDESFITO. Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. Disponível em: <[HTTP://www.2.far.fiocruz.br/redesfito/v2/?p=3064](http://www.2.far.fiocruz.br/redesfito/v2/?p=3064)>. Acesso em: 13 de março de 2015.

ROCHA, E. A. L. S. S. Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan. Dissertação de Mestrado. UEPB. 2014.

SAITO, L.M.; OLIVEIRA, F. Características Físicas e Químicas do Extrato Fluido de *Cordia ecalyculata*. V. I. p.3-9, 1984.

SOARES, L.A.L.; FARIAS, M.R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES, C.M.O.(Org) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, cap. 8, p. 83 -105, 2017.

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; PEREIRA, N.L. Avaliação da Permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 90(1):03-09, 2009.

SHEKER, K. M.; BLACK, H. J.; LACH, J. L. Silver allantoinate for the topical treatment of burns. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 29, n. 10, p. 852-855, 1972.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. **Vet Med Nauki**, v. 18, n.6, p. 87-94, 1981.

SMITH, D.B.; JACOBSON, B.H. Effect of a blend of comfrey root extract (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials. **J Chiropr Med**.v.10,n.3,p. 147-56. Sep 2011.

STAIGER, C. Comfrey root: from tradition to modern clinical trials. **Wien Med Wochenschr**, Feb;163(3-4):58-64, 2013.

SVETLICHNY, G. Desenvolvimento e avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de copaíba e alantóina. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2014.

TEIXEIRA, J.P.F., DUARTE, F.R. Avaliação do Teor de Ureídeos em Plantas de Confrei. **Bargantia**, 44(1): 487-492, 1985.

TOLEDO, A.C.O.; DUARTE, M.R.; NAKASHIMA, T. Caracterização morfoanatômica de raízes e rizomas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 185-191, 2006.

TOLEDO, A.C.O.; DUARTE, M.R.; NAKASHIMA, T. Análise farmacognóstica da droga e do extrato líquido das folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, 13(Supl. 2): 1-2, 2003.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP 40 ed., Rockville:United States Pharmacopeial Convention, p. 2631, 2017.

VAZ, A.P.A.; JORGE, M.H.A. Confrei [Folheto on line]. Corumbá: EMBRAPA; 2006. (Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas). Disponível em: <https://www.embrapa.br/pantanal/busca-de-publicacoes/-/publicacao/812803/confrei>. Acesso em: 11 de jul de 2017.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**. Santa Maria: UFSM, 2005.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2a. ed. Berlim: Spinger – Verlag, 2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (orgs.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: **Argos**, p.1-523, 2001.