



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e
avaliação do impacto das condições de cultivo e coleta
associados à sazonalidade na produção de óleo essencial de
Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.**

Fabíola Bernardo Carneiro

**Recife
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e
avaliação do impacto das condições de cultivo e coleta
associados à sazonalidade na produção de óleo essencial de
Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Fabíola Bernardo Carneiro

**Recife
2008**

Carneiro, Fabíola Bernardo

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e avaliação do impacto das condições de cultivo e coleta associados à sazonalidade na produção de óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng / Fabíola Bernardo Carneiro. – Recife: O Autor, 2008.

xiv, 58 folhas. il: fig., graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Medicamentos fitoterápicos. 2. ***Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.** I.Título.

615.322

CDU (2.ed.)

UFPE

615.32

CDD (22.ed.)

CCS2008-079

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e
avaliação do impacto das condições de cultivo e coleta
associados à sazonalidade na produção de óleo essencial de
Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.**

BANCA EXAMINADORA:

Membro Externo Titular

Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão - UFRN

Membros Internos Titulares

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo - UFPB

Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier - UFPE

Membros Suplentes

Prof^a. Dr^a. Miracy Muniz de Albuquerque - UFPE

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza - UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Jane Sheila Higino

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Samuel Daniel de Souza Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof^ª. Dr^ª. Beate Saegesser Santos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 06 de junho de 2008.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 06 de junho de 2008 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba-UFPB).

Assinatura: Rui Oliveira Macedo

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE)

Assinatura: Haroudo Satiro Xavier

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão (Deptº de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN).

Assinatura: Cícero Flávio Soares Aragão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por todas as bênçãos que me concede a cada momento.

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo**, pela orientação, confiança e amizade durante todo esse tempo.

A **UFPE**, que permitiu que esse trabalho fosse conduzido sob orientação do Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo; provando com isso que não há nada mais importante na comunidade acadêmica do que parcerias institucionais.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica da UFPE**, em especial seus Coordenadores, **Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto e Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos** agradeço por me concederem esta oportunidade.

Ao **Laboratório Rabelo** pela disponibilidade da sua estrutura física e técnica, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - LCQPF da Universidade Federal da Paraíba – UFPB**, pelo suporte técnico dispensado na execução dos trabalhos realizados.

Ao amigo **Prof. Dr. Irinaldo Diniz** com sua sabedoria, paciência, otimismo e amizade, que tudo fez para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao amigo **Prof. Dr. Fábio Santos Souza**, pelo incentivo na constante busca de aprimoramento profissional.

Aos amigos do **LCQPF, Lidiane, Valdilânio, Júlia, Francinalva, Jailton, João Paulo, Aline, Rodrigo 1 e 2.**

Aos amigos de pós-graduação **Lamartine, Mônica, Keila, Alexandre, Sarah, e Mariana** pelos muitos momentos de descontração que tivemos e apoio.

Aos que compõem o **Laboratório Rabelo, amigos e funcionários.**

A amiga **Eneida Torres** por seu apoio, amizade, alegria, entusiasmo e sua tranquilidade.

Ao amigo **Daniel Castro** pela amizade e entusiasmo.

Aos agrônomos **Fernando Viana e Profº Drº Roberto Vagner Raposo** por toda ajuda e dedicação.

Aos funcionários e professores da pós-graduação.

A meu marido, **Pablo Queiroz** por me incentivar nesta jornada.

Finalmente agradeço **a minha família** pelo incentivo de sempre continuar os estudos e pelo apoio em todos os momentos, o meu grande reconhecimento e agradecimentos.

E àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho ou estiveram presentes ao meu lado nesta conquista.

RESUMO

O Brasil encontra-se em uma importante fase no uso de medicamentos fitoterápicos, que passam a ter que satisfazer os mesmos critérios de eficácia e segurança exigidos para os medicamentos convencionais, obtidos por síntese. O registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004) estabelece o controle de qualidade da matéria-prima vegetal como pré-requisito essencial para a obtenção de fitoterápicos com reprodutibilidade de ação. Uma das dificuldades de se desenvolver fitoterápicos que apresentem estas características de reprodutibilidade lote a lote da ação terapêutica é a variabilidade na concentração de marcadores, decorrente dos efeitos de sazonalidade no cultivo das plantas. O presente trabalho estuda a relação existente entre algumas variáveis que podem estar relacionadas com a variação da quantidade de óleo essencial da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng cultivada, através do monitoramento do óleo essencial por cromatografia à gás. Foram conduzidos experimentos que tiveram o objetivo de avaliar a maior concentração de óleo essencial sob diferentes condições de adubação (adubo orgânico, adubo mineral 1 e adubo mineral 2), irrigação (irrigação diária e irrigação alternada), incidência solar (direta e indireta), horário de coleta (7h, 12h e 16h) e idade da planta (60, 90, 120 e 150 DAP), em diferentes ciclos vegetativos (1 e 2). Nas diferentes condições de adubação, foi verificado que no ciclo 1 o adubo orgânico obteve melhor desempenho e no ciclo 2 a adubação mineral 1 foi superior. A irrigação alternada e a incidência solar direta demonstraram ser a melhor condição nos dois ciclos. No ciclo 1 o melhor horário de coleta foi o das 7h, já no ciclo 2 o melhor horário foi o das 16h. A concentração de óleo essencial variou nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, tendo sido obtido os melhores índices aos 60 DAP no ciclo 1 e 2.

Palavras-chave: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, planta medicinal, sazonalidade, cromatografia gasosa.

Abstract

Currently, Brazil is in an important phase in the use of phytotherapy drugs, which are replaced by that meet the same standards of effectiveness and safety required for conventional medicines, obtained by synthesis. The registration of medicines phytotherapy (Brazil, 2004) provides the quality control of raw material plant as essential prerequisite for the achievement of phytotherapy with reproducibility of action. One of the difficulties of developing phytotherapeutic showing these characteristics of reproducibility lot to lot of action therapy is the variability in the concentration of markers, resulting from the effects of seasonality in the cultivation of plants. This study examines the relationship between variables that may be related to the change in the amount of essential oil of the species *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng grown, through the tracking of essential oil by gas chromatography. Were conducted experiments that had to evaluate the highest concentration of essential oil under different conditions of fertilizer (organic fertilizer, mineral fertilizer 1 and mineral fertilizer 2), irrigation (irrigation and irrigation alternating daily), solar impact (direct and indirect), hours of collection (7h, 12h and 16h) and age of the plant (60, 90, 120 and 150 DAP), in different growing seasons (1 and 2). In different conditions of fertilization, it was found that in the loop1 organic fertilizer obtained better performance and the cycle 2 to mineral fertilizer 1 was higher. The alternating irrigation and solar direct impact demonstrated to be the best condition in two cycles. In cycle 1 the best time of the collection was from 7 am, already in the cycle 2 was the best time of 16h. The concentration of essential oil varied in different stages of development of the plant, having been obtained the best rates at 60 DAP in the cycle 1 and 2.

Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, medicinal plant, seasonality, gas chromatography

Abreviaturas e siglas

CV	= Coeficiente de variação
DAP	= Dias após o plantio
DP	= Desvio padrão
dpr	= Desvio padrão relativo
fe	= Fase estacionária
FID	= Detector de ionização em chama
fm	= Fase móvel
CG	= Cromatografia à gás
LD	= Limite de detecção
LQ	= Limite de quantificação
MS	= Espectrômetro de massa
NPK	= Nitrogênio, fósforo e potássio
pH	= Potencial hidrogeniônico
PE	= Ponto de ebulição
PF	= Ponto de fusão
Xm	= Média

LISTA DE FIGURAS

Capítulo III

Artigo II - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do β -cariofileno em extratos vegetais de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng por cromatografia gasosa.

Figura 1. Equação da reta de calibração do β -cariofileno $y=a+bx$, que mostra a relação área de pico (y) e concentração do padrão (x)..... 33

LISTA DE GRÁFICO

Capítulo IV

Artigo III - Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng sob diferentes condições de cultivo.

Gráfico 1. Gráfico de estudo da sazonalidade do β -cariofileno. (Ciclo vegetativo 1) 49
 Gráfico 2. Gráfico de estudo da sazonalidade do β -cariofileno. (Ciclo vegetativo 2) 50
 Gráfico 3. Concentração (mg/ml) x índice pluviométrico em função de DAP..... 50

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

Artigo II - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do β -cariofileno em extratos vegetais de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng por cromatografia gasosa.

Tabela 1. Linearidade do método a partir de uma solução diluída em hexano com suas respectivas áreas, médias e três repetições.....	33
Tabela 2. Ensaio de repetibilidade (precisão intracorrída) com os valores médios das áreas de pico.....	34
Tabela 3. Avaliação da precisão intermediária em dias diferentes expresso em concentração em concentração de β -cariofileno.....	34
Tabela 4. Resultados da análise de exatidão.....	34
Tabela 5. Resultados da análise de robustez.....	35
Tabela 6. Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	35

Capítulo IV

Artigo III - Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng sob diferentes condições de cultivo.

Tabela 1. Precipitação de chuvas (índice pluviométrico) e temperatura.....	48
Tabela 2. Grupos experimentais.....	48
Tabela 3. Período de coleta.....	49

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	4
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos.....	5
 Capítulo I	
3. Revisão Bibliográfica.....	6
3.1. Aspectos gerais.....	7
3.2 Cromatografia à Gás.....	8
3.2.1 Aplicações.....	10
3.3 Validação.....	11
 Capítulo II	
Artigo I. Uso popular e ações farmacológicas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng.....	14
Resumo.....	15
1. Introdução.....	16
2. Referências bibliográficas.....	20
 Capítulo III	
Artigo II - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do β -cariofileno em extratos vegetais de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng por cromatografia a gás.....	23
Resumo.....	24
1. Introdução.....	25
2. Materiais e métodos.....	25
2.1. Identificação dos óleos essenciais.....	26
2.2 Quantificação do β -cariofileno	26
2.3 Preparação da solução padrão.....	26
2.4. Preparação da solução amostra.....	27
2.5 Procedimento para validação da metodologia analítica.....	27
3. Resultados e Discussão.....	29
3.1. Validação do ensaio.....	29
3.2. Performance do equipamento.....	30
4. Conclusão.....	31
5. Referências bibliográficas	32

Capítulo IV

Artigo III - Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng sob diferentes condições de cultivo.....	36
Resumo.....	37
1. Introdução.....	38
2. Materiais e métodos.....	39
2.1. Material vegetal.....	39
2.2. Local de cultivo e preparo do substrato: grupos experimentais.....	39
2.3. Coleta do material vegetal.....	40
2.4. Extração do óleo essencial e determinação do tempo de extração.....	40
2.5. Análise do óleo essencial.....	40
2.5.1. Quantificação do β -cariofileno.....	40
3. Resultados.....	41
4. Conclusão.....	45
5. Referências bibliográficas.....	46
Conclusão.....	52
Perspectivas.....	54
Referências Bibliográficas.....	56

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, plantas têm sido utilizadas como medicamentos, na prevenção, no tratamento e na cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais. Capasso (1986); Garcia et al. (2003); Korolkovas (1996); Rates (2001). Os povos primitivos iniciaram a identificação de vegetais que melhor se adequavam ao uso medicinal, da época de colheita, das técnicas de extração e de modos de conservação. Garcia *et al.* (2003); Korolkovas (1996).

A descoberta de substâncias ativas em plantas medicinais impulsionou uma revolução científica e tecnológica e os medicamentos vegetais foram sendo substituídos por fármacos sintéticos. Capasso (1986); Korolkovas (1996); Rates (2001). Nas últimas décadas, porém, tem-se verificado tendência mundial de aumento na demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico, influenciado por fatores econômicos, sociais e culturais. Abu-Irmaileh; Afifi (2003); Bent; Ko (2004); Calixto (2000); Capasso (1986); Chan (2003); De Smet (2004); Elvin-Lewis (2001); Giveon *et al* (2004); Mahady (2001).

A maior industrialização e comercialização de medicamentos naturais tornaram seu uso um problema de Saúde Pública. O aumento da demanda, associado à falta de fiscalização efetiva que garanta desde a exploração racional dos recursos naturais empregados como matéria-prima, até a dispensação do produto acabado, contribuem para a disponibilidade e acesso a produtos muitas vezes sem condições adequadas ao uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficiência, fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor. Bent; Ko (2004); Calixto (2000); Chan (2003); De Smet (2004); Elvin-Lewis (2001); Giveon *et al* (2004); Rates (2001); Marques (1996). Fatores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e estocagem são importantes a serem considerados no controle de produtos naturais. Abou- Arab et al. (1999); De Smet (2004); Fennell et al. (2004). Considerando os produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, verifica-se a importância de especificações adequadas de qualidade para garantir a eficácia e segurança.

Plantas não cultivadas possuem desvantagens em relação às cultivadas por ocorrer disponibilidade decrescente, fornecimento instável, controle de qualidade falho,

sendo passível de adulterações: havendo por isso, interesse crescente em se utilizar métodos de cultivo para as plantas medicinais, permitindo avançar com melhor aproveitamento da variabilidade contida nas espécies empregando-se, para tanto, rigorosos métodos de seleção visando obter plantas de princípios ativos desejados.

Entendendo que é importante verificar nos produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, as especificações adequadas de qualidade para garantir a eficácia e segurança. Considerando que a biossíntese dos metabólitos secundários e, conseqüentemente, dos princípios ativos em plantas medicinais e aromáticas depende de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Logo, os fatores que influenciam as variações nas concentrações destes princípios ativos em plantas devem ser avaliados, visando obter uma matéria-prima de qualidade, já que a qualidade das plantas medicinais está relacionada ao seu teor de princípios ativos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da variação sazonal e diferentes técnicas de coleta e cultivo no teor de óleo essencial presente na espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng através da quantificação deste por meio do marcador β -cariofileno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver plantio experimental da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng;
- Coletar as amostras vegetais de acordo com metodologia definida;
- Realizar extração do óleo essencial;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para a quantificação de óleo essencial através do marcador β -cariofileno por cromatografia gasosa.

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfico

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais

No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram a utilização de ervas e outros vegetais, como forma de medicamento, em seus registros e manuscritos, como os babilônios, sumerianos, egípcios, gregos e os romanos. Devienne (2004).

Na primeira metade do século XX, os produtos de origem vegetal foram esquecidos, temporariamente, em decorrência do grande sucesso dos compostos químicos obtidos de microorganismos, os quais eram capazes de curar infecções graves. Devienne (2004).

A descoberta de princípios ativos, em plantas medicinais, impulsionou uma revolução científica e tecnológica e os fitoterápicos foram sendo substituídos por fármacos sintéticos. Capasso (1986); Korolkovas (1996); Rates (2001).

A obtenção de novos fármacos, a partir de substâncias sintéticas, não foi mantida por muito tempo devido os elevados custos para as suas pesquisas e desenvolvimento. Dados indicam que o custo médio de um novo medicamento pode variar de 100 a 300 milhões, representando cerca de 15% do faturamento da indústria farmacêutica. Várias pesquisas demonstram que medicamentos originados de plantas medicinais são desenvolvidos em menor tempo com custos, muitas vezes, inferiores aos obtidos sinteticamente. Yunes (2001); Devienne (2004).

Como as plantas medicinais constituem importantes fontes de compostos bioativos, foram incorporadas em diversas formulações farmacêuticas industrializadas.

Nas últimas décadas, tem-se verificado tendência mundial de aumento na demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico, influenciado por fatores econômicos, sociais e culturais.

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que o mercado mundial de fitoterápicos atingiu em 2001 em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. Yunes (2001).

Nas duas décadas passadas inúmeros esforços têm sido dirigidos para conferir às plantas seu real papel e valor na terapia. Tal paradigma refere-se principalmente às suas aplicações na cura, disfunções e distúrbios orgânicos. Santos (1995).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que a prática do uso de plantas medicinais é tida com a principal opção terapêutica de aproximadamente 80 %

da população mundial e relata que as plantas medicinais seriam a maior e a melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade. Tal aceitação está contida no programa daquela organização intitulado: “Saúde para todos no ano 2000” Santos (1995).

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climáticas-edáficas. Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação. Migliato (2007).

Dentre as técnicas de controle do processo extrativo encontram-se as técnicas cromatográficas, com as quais torna - se possível realizar avaliações tanto qualitativa quanto quantitativas. A análise da composição da droga vegetal e de preparações extrativas derivadas pode ser direta, através de cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia à gás, ou indireta, com o emprego de cromatografia em camada delgada ou cromatografia em papel, seguidas de extração do componente e determinação por análise química quantitativa ou físico-química tais como térmicas, volumetria, espectrofotometria, fotolorimetria ou densitometria.

Apesar das técnicas mencionadas serem performantes em análise quantitativa, podem ser qualitativas em concepção normal ou com acoplamentos com detectores específicos. Essas técnicas buscam o conhecimento da distribuição das espécies na amostra com a finalidade de seletividade e isolamento para a identificação ou quantificação.

3.2 Cromatografia à Gás

A cromatografia à gás é uma técnica analítica, qualitativa e quantitativa, que permite a separação de compostos de uma mistura (amostra) através da partição dos componentes da amostra entre uma fase líquida (estacionária) e uma fase gasosa (móvel). A interação que ocorre entre os componentes da amostra e as duas fases é do tipo partição gás-líquido, onde a fase estacionária é um líquido não-volátil ligado à parede interna de um tubo capilar de sílica fundida, e a fase móvel é um gás inerte, chamado gás carreador, H₂, N₂ ou He. Medeiros (2006b).

A amostra é introduzida no equipamento através de um injetor sob aquecimento, favorecendo a vaporização dos compostos, um fluxo de gás contínuo carrega a amostra através da coluna, que se encontra em um forno, onde a temperatura pode se manter constante, ou aumentar através de uma rampa de aquecimento. Essa programação de temperatura favorece uma melhor separação dos compostos e diminui o tempo de análise. O analito segue até um detector que gera um sinal para um sistema de aquisição. Rouessac *et al.*, (2000). A figura 01 apresenta um esquema de equipamento de cromatografia gasosa.

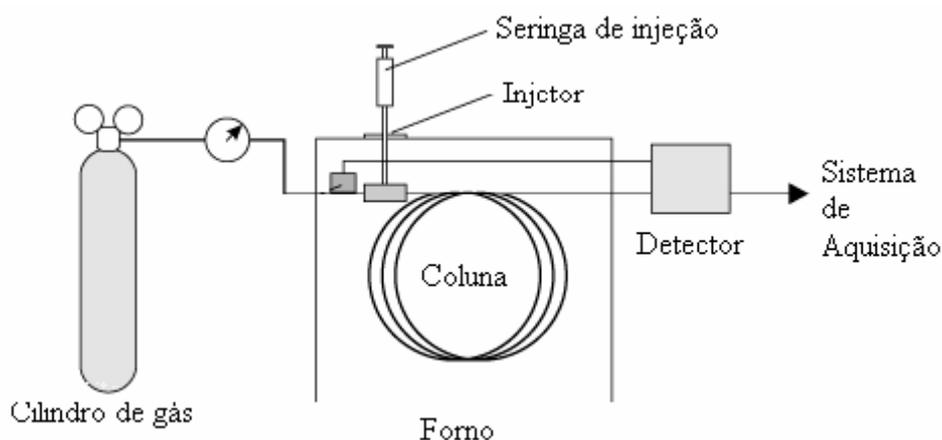


Figura 01: Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás.

A cromatografia à gás é um dos métodos mais utilizados para a análise quantitativa e qualitativa de componentes voláteis, ou passíveis de derivatização. Esta técnica possui alto poder de resolução, o que torna possível a análise de dezenas de compostos de uma mesma amostra. A identificação pode ser feita comparando-se o tempo de retenção de um padrão com o da amostra, ou relacionar o logaritmo de um dado de retenção com uma outra propriedade da amostra, como temperatura de ebulição, números de átomos de carbono ou massa molecular, este método é chamado de índice de retenção de Kovats. Harris (1998). O índice de retenção tem a vantagem de variar muito pouco, ou de maneira linear, com a temperatura.

Vários detectores podem ser utilizados, como Detector de Ionização por Chama (FID), considerado universal já que é capaz de detectar qualquer substância orgânica; Detector de Condutividade Térmica, que se baseia na modulação da condutividade térmica dos gases de arraste pelos analitos; Detector de Nitrogênio/Fósforo; de Infravermelho por Transformada de Fourier; e Espectrometria de Massas, que é seletivo, sensível e universal. Collins *et al.*, (1997).

Dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado, consegue-se detectar até cerca de 10^{-12} g. Essa sensibilidade faz com que haja necessidade de introduzir apenas pequenas quantidades de amostra (respeitando sempre a capacidade de massa das colunas capilares), o que em certos casos é uma grande vantagem em relação a outras técnicas que necessitam quantidades maiores de amostra. Vogel (1992). É importante salientar que a cromatografia à gás é excelente como técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas.

A cromatografia à gás é uma técnica com excelente poder de resolução, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Um dos principais motivos que a torna de uso bastante acentuado é a sua sensibilidade.

A cromatografia à gás se aplica à análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis. Esta é a principal limitação de seu uso. Entretanto, mesmo com substâncias não voláteis, muitas vezes é possível formar um derivado com estas características através da reação do analito com um reagente de derivatização. Willard *et al.*, (1992). Esta consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para serem analisadas por cromatografia gasosa. A derivação também pode ser usada para a introdução de grupos específicos. A análise cromatográfica isoladamente é rápida, podendo ser efetuada em minutos. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna cromatográfica. Às vezes, esta etapa de preparação é longa e complexa, aumentando em muito o tempo e o custo da análise. Além disso, a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra. Willard *et al.*, (1992).

3.2.1 Aplicações

A cromatografia gasosa é, atualmente, uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para a separação e quantificação de produtos diversos, podendo, também, ser usada como técnica de identificação, em casos especiais, principalmente quando acoplada um espectrômetro de massas. O recente avanço na área de utilização de colunas capilar faz da cromatografia gasosa uma técnica altamente atrativa. Alvarez (2004).

Assim, a cromatografia gasosa está sendo usada nas mais diversas áreas, como na análise ambiental, nas indústrias químicas e farmacêuticas, na análise de alimentos e de produtos petroquímicos, na medicina, nas pesquisas e outras. Alvarez (2004).

A análise ambiental pode-se citar como exemplo, a utilização de cromatografia gasosa no controle da poluição de ar, água, solos, etc. Exemplos interessantes estão ligados à análise de resíduos de pesticidas, herbicidas e fungicidas.

As indústrias químicas e farmacêuticas podem utilizar a cromatografia gasosa desde a análise da matéria prima, até a do produto acabado. Na indústria alimentícia pode-se usar a cromatografia gasosa para análise de alguns constituintes de alimentos, como lipídeos e carboidratos. Em alguns casos, com técnicas adequadas de concentração de amostra, podem ser detectados constituintes alimentícios ao nível de traços, como exemplo, esferóides e vitaminas.

A área médica também encontra na cromatografia gasosa uma ferramenta poderosa, tanto no estudo de substâncias endógenas, como no controle terapêutico de certas drogas, ou em casos de intoxicação.

Pesquisas nas mais diversas áreas podem usar a cromatografia gasosa, tornando-a de grande utilidade nos laboratórios.

3.3 Validação

A técnica de cromatografia à gás vem sendo utilizada por apresentar uma variedade de parâmetros passíveis de modificação, pelo operador, para otimizar o procedimento de separação dos constituintes, além da facilidade na manipulação do equipamento e a presença de *softwares* modernos que possibilitam análises completas dos cromatogramas.

Aliados ao desenvolvimento de metodologias analíticas quantitativas utilizando cromatografia à gás estão os procedimentos de validação, onde órgãos regulamentadores como International Conference on Harmonization (ICH), Farmacopéia Americana (USP), e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem normas para a sua realização, garantindo assim a confiabilidade nos resultados alcançados.

Podem ser encontrados na literatura um número significativo de trabalhos que apresentam métodos de quantificação de substâncias químicas em medicamentos utilizando cromatografia à gás que apresentam metodologia de análise validada. Por outro lado, para matérias-primas vegetais ou fitoterápicos, a publicação de trabalhos que

relatam o desenvolvimento e a validação de metodologias para a realização do controle de qualidade está em ascensão. Sendo assim, os parâmetros de performance analítica utilizados estão fundamentados naqueles utilizados para os medicamentos, segundo USP (1994), ICH (1996), Swartz; Krull (1997), Hong; Shah (2000), BRASIL (2003), Shabir (2003), Ribani et al. (2004), são eles:

Especificidade / Seletividade — Um método instrumental de separação que produza resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produza resposta para vários compostos químicos com características em comum, seletivo. Apesar do termo mais adequado para a descrição do parâmetro seja seletividade, o ICH (1996) e a USP (1994) consideram especificidade como o termo correto. Então, especificidade traduz-se como a capacidade de medir exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes que podem ser esperados na amostra (cada um dos ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação bem como outros compostos de propriedades similares). Se a especificidade não for assegurada, a linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidas.

Linearidade — Corresponde à capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação que deve possuir, no mínimo, cinco concentrações no intervalo de 80 — 120%. O comportamento dos resultados obtidos com a análise deve ser descrito por uma equação linear. (BRASIL, 2003)

Exatidão — Indica o percentual de recuperação de um composto (substância referência, marcador) adicionado à uma amostra cuja concentração é conhecida. Para esta análise, devem-se executar no mínimo três níveis de concentração. (BRASIL, 2003)

Precisão - É a medida de concordância entre valores experimentais obtidos que resultam da aplicação repetida do método à amostra homogênea. Usualmente é avaliada nos resultados o desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), que corresponde ao desvio padrão relativo (dpr). O ICH (1996) e a resolução nº 899 (BRASIL, 2003) concordam que a precisão pode ser medida em três níveis:

- Repetibilidade: medição de precisão entre ensaios com condições analíticas mantidas. A avaliação do resultado ocorre através de medições sucessivas em

um curto período de tempo de uma mesma amostra, porém em diferentes preparações, como pela avaliação de seis determinações a 100% da concentração teórica da amostra, ou nove determinações em três níveis de concentração.

- **Precisão Intermediária:** expressa a variabilidade em longo prazo de um processo de determinação. Indica o efeito das variações dentro de um laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou equipamentos. É a mais representativa variabilidade dos resultados em único laboratório e podem ser monitoradas as variáveis individuais dos analistas (rotina analítica). Expresso em DP ou DPR.
- **Reprodutibilidade:** refere-se a estudos colaborativos entre laboratórios, no sentido de reprodução dos resultados da metodologia de análise aplicada.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) — O primeiro pode ser definido como a menor concentração do analito detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LQ representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, ambos sob as condições experimentais previamente estabelecidas. Podem ser calculados com dados obtidos do desvio padrão do intercepto e da inclinação da curva de calibração, previamente construída com o composto de interesse. Outros meios para determinação do LD e LQ são aqueles baseados na avaliação visual em métodos não instrumentais e na relação sinal-ruído para procedimentos analíticos que exibem ruído de base. (BRASIL, 2003)

Robustez — Medida da capacidade do método de análise em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Para cromatografia gasosa os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez são: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e velocidade do gás de arraste. (BRASIL, 2003)

Na validação de metodologias analíticas cromatográficas o ICH (1996) e a USP (1994) reconhecem que não existe a necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros devem ser investigados. Swart; Krull (1997). Então, é de inteira responsabilidade do analista identificá-los para que os resultados gerados pela aplicação do método sejam de total confiabilidade quando o seu uso for rotineiro.

CAPÍTULO II

ARTIGO I

**Título: Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus amboinicus* (Lour)
Spreng.**

Artigo submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia.

Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.

Fabiola B. Carneiro^{1*}, Irinaldo D. Júnior², Pablo Q. Lopes¹, Rui O. Macêdo²

¹Depto. de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife – PE.

²Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos – LUDEM – Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campos 1, CEP 58059-900, João Pessoa – PB.

RESUMO

Os principais usos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng relatados pela população são relacionados ao tratamento de uma grande variedade de distúrbios gástricos, porém um grande número de ações farmacológicas foram testadas e comprovadas. Entre os aspectos farmacológicos mais estudados, destacam-se: Dispepsias orgânicas, tratamentos de pele, broncodilatação, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiepilética e antitumoral. Visando contribuir para um maior conhecimento da espécie apresentamos uma revisão das principais publicações envolvendo estudos químicos e farmacológicos.

Palavras-chaves: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, plantas medicinais, farmacologia.

Popular use and pharmacological actions of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.

ABSTRACT

The main uses of the *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng told by the population are related to the treatment of a great variety of gastric riots; however a great number of pharmacological actions had been tested and proven. It enters the studied pharmacological aspects more, are distinguished: Dyspepsia organic, treatments of skin, bronchodilator activity, anti-inflammatory, antiphonic, antibacterial, antiepileptic and antitumoral. Aiming at to contribute for the enrichment of the knowledge regarding this species, a revision of the main publications involving chemical and pharmacological studies.

Key words: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, medicinal plants, pharmacology.

INTRODUÇÃO

As espécies de *Plectranthus* (Lamiaceae) são usadas na medicina popular em várias partes do mundo (Hedge, 1992). O gênero ocorre em quatro continentes: África, América, Oceania e Ásia e estudos fitoquímicos divulgaram que diterpenos abietanos e triterpenóides são os metabólitos mais comuns no gênero, sendo responsável por variadas e importantes propriedades medicinais tais como: antiviral, antifúngica, anti-hipertensiva entre outras. O óleo essencial das folhas de algumas espécies de *Plectranthus* tem sido estudado previamente, principalmente *P. barbatus* e *P. amboinicus* (Albuquerque, R. L, 2000).

Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng é uma planta aromática nativa da Ásia do Sul Oriental, encontrada em toda América tropical (Hedge, 1992). É uma erva perene, tortuosa, piloso-tormentosa e aromática. No Nordeste brasileiro não chega a produzir flores. Possui um óleo essencial responsável por variadas e importantes propriedades medicinais, dentre elas antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, etc (Albuquerque, R. L, 2000).

A *Plectranthus amboinicus* e a *Plectranthus barbatus* são usados para tratar uma larga escala de doenças e estão relacionadas a aproximadamente 68% de todos os usos tradicionais do gênero.

Os sinônimos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng incluem: *Plectranthus aromaticus* Roxb, *Coleus aromaticus* Benth e *Coleus amboinicus* Lour.

Popularmente conhecida por hortelã da folha grossa, é um anti-séptico bucal, demulcente e balsâmico, muito útil no tratamento de rouquidão, de inflamações da boca e garganta, sendo também usado tradicionalmente, contra tosse e bronquite, na forma de xarope (lambedor) e de balas. As folhas inteiras podem ser sugadas lentamente no caso de rouquidão ou dor de garganta. É utilizado popularmente como expectorante e para tratar a dor de ouvido (Diniz et al., 1998).

A *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng também é citada freqüentemente no tratamento de gripe crônica, de asma, de bronquite e de inflamação da garganta na Índia e no Caribe (Morton, 1992; Jain; Lata, 1996; Ruiz et al., 1996), e em Cuba é usada para tratar infecções e a asma (Castillo; Gonzalez, 1999; Cano; Volpato, 2004). Nas folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng foram encontradas atividade broncodilatadora em cobaia e atividade anti- tuberculose (Carbajal et al., 1991; Frame et al., 1998).

Os principais constituintes químicos são óleos essenciais, como carvacrol, cariofileno, terpineol e timol; flavonóides com apigenina, quercetina, luteonina e taxifolina; além de ácidos terpênicos e taninos (Carriconde et al., 1995).

A hortelã da folha grossa apresentou atividade antibacteriana, exercida pelo timol e carvacrol presentes no óleo essencial da planta e, devido a isso, ocorre uma melhora nas patologias do trato respiratório. O carvacrol tem uma reconhecida ação germicida, anti-séptica e antifúngica (Matos, 1994).

Um estudo avaliou a atividade antifúngica “in vitro” da hortelã da folha grossa frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal, mostrando que os extratos da planta revelaram atividade antifúngica a partir da concentração de 2500 mg/mL (Queiroz, 1998).

A *Plectranthus barbatus* e a *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng são as espécies mais freqüentemente citadas para o tratamento das queimaduras, das feridas, das mordidas de inseto e das alergias.

É usada no Brasil para o tratamento das ulcerações da pele causados pela *Leishmania brasiliense* (França et al., 1996). É usada também para tratar queimaduras e em mordidas de escorpião na Malásia (Morton, 1992). Na Índia, o suco das folhas é usado para tratar alergias da pele (Harsha et al., 2003).

A *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng é usado para tratar uma grande variedade de problemas digestivos.

Uma atividade antioxidante, que pode prevenir a formação de úlceras, foi detectada, “in vitro”, provavelmente devido ao conteúdo de flavonóides das folhas da hortelã da folha grossa (Salmán et al., 1996).

É popular no tratamento da dispepsia, indigestão, diarreia e como carminativo na Índia e na África (Morton, 1992; Gurib-Fakim et al., 1996; Jain; Lata, 1996; Ong; Nordiana, 1999)

Em camundongo Swiss ficou demonstrado intenso efeito antinociceptivo periférico e central com a administração da hortelã da folha grossa (Nunes et al., 2000).

Revisão de Castillo & Gonzáles (1999), mostrou que há alguns estudos de farmacologia pré-clínica identificando atividades antitussígenas e antiepiléticas.

A *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng é usada no Caribe para tratar falha congestiva do coração (Morton, 1992).

Entre as espécies de *Plectranthus* usadas no tratamento de distúrbios nervosos inclui-se a *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. Prescreve-se nos casos de epilepsia,

de convulsão (Morton, 1992; Ruiz et al., 1996; Castillo; González, 1999) e meningites (Neuwinger, 2000).

As espécies de *Plectranthus* são usadas também para tratar as desordens sensoriais associados ao ouvido e ao olho. Por exemplo, o óleo de semente de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng é utilizado no tratamento de otite na Polinésia (Zepernick, 1972), visto que na Índia suas folhas são friccionadas nos olhos para aliviar as conjuntivites (Morton, 1992).

Um número de espécies, incluindo a *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (Bhakuni et al., 1969), tem a atividade citotóxica e anti-tumoral e pode ser usada no tratamento do câncer.

É importante na Ásia e na América do Sul para o tratamento das febres (Morton, 1992; Harsha et al., 2002) e na cura do cólera (Gurib-Fakim et al., 1996). Tem também a atividade antimicrobiana (Bos et al., 1983; Castillo; González, 1999) e são relatadas atividades antivirais de encontro à inibição simples (Hattori et al., 1995) sendo anti-HIV e Herpes virus-1 (Kusumoto et al., 1995).

As folhas são utilizadas freqüentemente no tratamento de doenças urinárias no Amazonas e na Índia (Jain; Lata, 1996; Yoganarasimhan, 2000). Há relatos de uso para aliviar problemas geniturinários, e é bebida também após o parto (Morton, 1992).

Não deve ser ingerida em grandes quantidades por crianças e lactentes, bem como deve ser utilizada com moderação antes de dormir por poder provocar insônia (Colegate, 1993).

Experimento utilizando o extrato aquoso bruto da folha da hortelã da folha grossa nas doses de 400 e 600 mg/kg não apresentou manifestações tóxicas em ratos Wistar bem como nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, linfócitos e neutrófilos) e bioquímicos (glicose, creatinina, bilirrubina total e direta, fosfatase alcalina, colesterol total, lipídios totais, triglicerídios, AST, ALT e uréia) (Nunes et al., 1998).

Como gênero alimentício as folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng são empanadas com farinha e fritas no óleo ou na manteiga (Dymoc, 1885). São usadas no preparo do alimento (Purseglove, 1987), como tempero de carne e galinha (Epling, 1981; Kuebel; Tucker, 1988; Bodner; Gereau, 1988; Craig; Mayenda, 1990; Marrom, 1997), e para mascarar o cheiro forte associado a cabra, aos peixes e aos mariscos (Morton, 1992). As folhas são às vezes comidas cruas com pão e manteiga e na Índia, podem ser adicionadas à cerveja e ao vinho (Morton, 1992).

A revisão dos trabalhos publicados envolvendo ações farmacológicas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, evidencia o potencial medicinal da espécie justificando a grande utilização na medicina popular.

A potencialidade terapêutica de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng demonstra a necessidade de investimentos nesta planta para fins industriais, sendo imprescindível à realização de estudos sobre o cultivo desta espécie visando à padronização da matéria-prima a ser utilizada em futuros medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque R L 2000. *Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: Plectranthus barbatus Andr. e Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.*

Bhakuni D S, Dhar M L, Dhar M M, Dhawan B N, Mehrotra B N 1969. *Screening of Indian plants for biological activity. Part II. Indian J Experim Biol* 7: 250–262.

Bos R, Hendriks H, van Os F H, 1983. *The composition of the essential oil in the leaves of Coleus aromaticus Benthams and their importance as a component of the species antiaphthosae. Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition:* 5, 129–130.

Brown D 1997. *Grenada: isle of spices. Herbs:* 22, 6–7.

Cano J H, Volpato G 2004. *Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. J Ethnopharmacol* 90: 293–316.

Carbajal D, Casaco A, Arruzazabala L, Gonzalez R, Fuentes, V 1991. *Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. Journal of Ethnopharmacol* 33: 21–24.

Carriconde C et al 1995. *Plantas medicinais e plantas alimentícias. V. 1. Olinda: Centro Nordeste de Medicina Popular: Universidade Federal Rural de Pernambuco:* v. 1, 63-5.

Castillo R A M, Gonz'alez V P 1999. *Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. Revista Cubana de Plantas Medicinales* 3: 110–115.

Colegate S M 1993. *Bioactive natural products.* CRC Press, New Cork.

Diniz M F F M, Oliveira R A G, Medeiros A C et al 1998. *Memento fitoterápico. As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos.* João Pessoa: Editora Universitária / UFPB:35-8, 92-4.

Dymoc W 1885. *The Vegetable Materia Medica of Western India.* Education Society Press, Bombay, India.

Frame A D, Riosolivares E, De Jesus L, Ortiz D, Pagan J, Mendez S 1998. *Plants from Puerto Rico with anti-Mycobacterium tuberculosis properties.* Puerto Rico Health Science Journal: 17, 243–253.

França F, Lago E L, Marsden P D 1996. *Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to Leishmania (Viannia) braziliensis in an endemic area of Bahia, Brazil.* Revista-Sociedade Brasileira de Medicinal Tropical: 29, 229–232.

Gurib-Fakim A, Sweraj M D, Gueho J, Dulloo E 1996. *Medicinal plants of Rodrigues. International J Pharmacog* 341: 2–14.

Harsha V H, Hebbar S S, Shripathi V, Hedge G R 2003. *Ethnomedicobotany of Uttara Kannada District in Karnataka, India; plants in treatment of skin diseases. J Ethnopharm* 84:37–40.

Hattori M, Nakabayashi T, Lim Y A, Miyashiro H, Kurokawa M, Shiraki K, Gupta M P, Correa M, Pilapitiya U 1995. *Inhibitory effects of various Ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of Herpes simplex Virus-1 in vitro and in vivo. Phytotherapy Research* 9: 270–276.

Hedge I C 1992 *Advance in Labiate.*: 7-17.

Jain S K, Lata S 1996. *Amazonian uses of some plants growing in India. Indigenous Knowledge and Development Monitor* 4: 21–23.

Kuebel K R, Tucker A O, 1988. *Vietnamese culinary herbs in the United States. Economic Botany* 42: 413–419.

Kusumoto I T, Nakabayashi T, Kida H, Miyashiro H, Hattori M, Namba T, Shimotohno K 1995. *Screening of various plant extracts used in Ayurvedic medicine for inhibitory effects on Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Protease. Phytotherapy Research* 9: 180–184.

Matos F J A 1994. *Farmácias vivas; sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. Fortaleza: 2 ed. EUFC: 122.*

Morton J F 1992. *Country borage (Coleus amboinicus Lour.): a potent flavoring and medicinal plant. Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants* 1: 77–90.

NAPRALERT. Banco de dados. Natural Products Alert. Chicago, EUA, 2004.

Neuwinger H D, 2000. *African Traditional Medicine. A Dictionary of Plant Use and Applications. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart:406–408.*

Nunes S T, Holanda W P, Carvalho T M J P et al 1998. *Estudo de toxicidade subcrônica dos extratos aquosos brutos de Plectranthus amboinicus e Argeratum conyzoides. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 15, Águas de Lindóia, 1998. Anais.....: 173.*

Ong H C, Nordiana M 1999. *Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia. Fitoterapia* 70: 502–513.

Purseglove J W 1987. *Tropical Plants. Dicotyledons. Longman Scientific & Technical.*

Queiroz M V F 1998. *Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras do gênero cândida isoladas da cavidade bucal. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa integrado de pós-graduação em odontologia da Universidade Federal da Paraíba.*

Ruiz A R, De La Torre R A, Alonso N, Villaescusa A, Betancourt J, Vizoso A, 1996. *Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in Aspergillus nidulans. J Ethnopharm* 52: 123–127.

Salmán J D G, Jimenez T E G, Castillo R M et al 1996. *Efecto antioxidante de los extractos fluido y flavonóides del Plectranthus amboinicus (orégano francés). Rev. Cub. Plant. Méd.*, v. 1, n. 2: 27-30.

Yoganarasimhan S N 2000. *Medicinal Plants of India. Cyber Media*, Bangalore, p. 2.

Zepernick B 1972. *Arzneipflanzer der Polynesier. Dietrich Reimer*, Berlin.

CAPÍTULO III

ARTIGO II

Título: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do β -cariofileno em extratos vegetais de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng por cromatografia a gás.

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmácia.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do β -cariofileno em extratos vegetais de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng por cromatografia a gás.

Fabíola B. Carneiro^{1*}, Irinaldo D. Júnior², Pablo Q. Lopes¹, Rui O. Macêdo²

¹Depto. de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife – PE.

²Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos – LUDEM – Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campos 1, CEP 58059-900, João Pessoa – PB.

RESUMO

A espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng é usada na medicina popular em várias partes do mundo por apresentar um óleo essencial responsável por variadas e importantes propriedades medicinais. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar a metodologia analítica, por cromatografia a gás, para a determinação de β -Cariofileno. O presente método desenvolvido e validado mostrou-se sensível, preciso, reprodutível, robusto e linear na concentração de 0,050 $\mu\text{g/mL}$ à 0,450 $\mu\text{g/mL}$ de β -Cariofileno.

Palavras-chaves: Validação, β -Cariofileno, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

The species *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng is used in popular medicine in various parts of the world to present an essential oil responsible for varied and important medicinal properties. The purpose of this study was to develop and validate the analytical methodology by gas chromatography, for the determination of β -caryophyllene. The method developed and validated proved to be sensitive, accurate, reproducible, robust and linear in the concentration of 0,050 $\mu\text{g/mL}$ à 0,450 $\mu\text{g/mL}$ of β -caryophyllene.

Key words: Validation, β -caryophyllene, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng é uma planta aromática nativa da Ásia do Sul Oriental, encontrada em toda América tropical (HEDGE, 1992). É uma erva perene, tortuosa, piloso-tormentosa e aromática. No Nordeste brasileiro não chega a produzir flores. Possui um óleo essencial responsável por variadas e importantes propriedades medicinais, dentre elas antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, etc (ALBUQUERQUE, 2000).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (BRITO et al, 2003).

A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises.

O principal objetivo da validação de metodologias analíticas é assegurar que o método seja exato, específico, reprodutível e resistente dentro da variação especificada para a substância em exame, assegurando assim sua credibilidade no uso rotineiro (USP, 1994).

Os objetivos deste trabalho consistem no desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o doseamento do β -cariofileno do óleo essencial extraído de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.

MATERIAL E MÉTODOS

A substância química de referencia usada (β -cariofileno) foi obtida do fabricante Sigma-Aldrich (USA). A planta fresca *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng foi coletada no canteiro experimental do Laboratório Rabelo.

Os estudos quantitativos e qualitativos dos óleos essenciais obtidos a partir de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng foram realizados em dois tipos de técnicas de detecção:

- Identificação dos constituintes voláteis de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.

As análises de identificação dos constituintes voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas. Foi realizado em um sistema Shimadzu GC/MS-QP5050A equipado com uma coluna capilar DB-5 5 fenil methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm; 0,10 micron). O gás de arraste utilizado foi o Helio com fluxo de 1,6 ml/min, split 1:200, temperatura do injetor 260 °C; temperatura inicial da coluna igual a 60 °C aquecida em uma razão de 10 °C/ min até 280 °C. O volume de injeção foi de 1,0 µl. Tempo de análise de 30 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado no modo SCAN com escala de varredura de 50-400 u.m.a com impacto de elétrons (70 eV) e temperatura do detector igual a 280 °C.

- Quantificação do β -cariofileno.

Os estudos de quantificação foram realizados em um Cromatografo Gasoso da Shimadzu (modelo GC-17A) equipado com uma coluna capilar DB-1 dimethylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm; 0,25 micron) e detector de ionização em chama (FID) foi usado para analises das amostras. O gás de arraste foi N₂ com fluxo de 1,3 ml/min, split 1:5, temperatura do injetor 260 °C; temperatura do detector 280 °C; temperatura inicial da coluna igual a 60 °C aquecida em uma razão de 8 °C/ min até 280 °C permanecendo por 10 minutos a esta temperatura. O volume de injeção foi de 1,0 µl. Tempo de análise de 30 minutos.

- Preparação da solução padrão

A solução padrão de 0,180 µg/ml foi preparada diluindo 0,20 ml da substância química de referencia (β -cariofileno) em 20 ml de hexano e uma alíquota de 0,5 ml desta solução foi diluída em 25 ml de hexano.

- Preparação da solução amostra

Os óleos essenciais obtidos da planta fresca de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng foram analisados a fim de se observar a presença de marcadores (β -cariofileno) e possíveis interferentes.

As plantas foram coletadas às 7h, 12h e 16h e submetidas, separadamente, à hidrodestilação em aparato de Clevenger, seguindo os parâmetros da Farmacopéia brasileira IV edição, utilizando aproximadamente 60 g de material vegetal.

O tempo de extração foi determinado através da quantificação das frações hexânicas obtidas por clivenger em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas e analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID), para tanto após 7 horas de análise foi observado a não mais presença de componentes voláteis, sendo dessa forma definido o tempo de 7 horas para extração dos óleos essenciais.

- Procedimento para validação da metodologia analítica

O protocolo de validação analítica aplicado no estudo baseou-se nas recomendações da Resolução RE 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para matéria-prima, estabelecendo os seguintes parâmetros:

A especificidade do método foi demonstrada através da injeção da solução padrão, da solução amostra e do solvente (hexano). As injeções foram executadas a fim de demonstrar a ausência da interferência que possam promover eluição com o pico da substância química de referência (β -cariofileno).

A linearidade da curva área versus concentração do β -cariofileno (padrão) foi obtida na seguinte faixa de concentração 0,050 $\mu\text{g/mL}$ à 0,450 $\mu\text{g/mL}$. A linearidade da curva foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas.

Os estudos de repetibilidade e precisão intermediária foram realizados utilizando seis replicas de diluições da solução padrão. A repetibilidade foi avaliada no mesmo dia, para cada amostra, e a precisão intermediária foi realizada em três dias consecutivos, também para cada amostra. Os estudos seguiram o método proposto e os dados foram expressos como desvio padrão relativo (dpr). A repetibilidade e precisão intermediária

da solução padrão foram analisadas nas concentrações de β -cariofileno equivalente a 0,180 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

A exatidão do método foi realizada através dos estudos de recuperação do β -cariofileno a partir da matriz vegetal, por intermédio da adição de uma quantidade conhecida do padrão do β -cariofileno ao extrato de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (Brasil, 2003), sendo expresso a partir do resultado encontrado (concentração média experimental) dividido pelo valor adicionado (concentração teórica) multiplicado por 100, sendo a recuperação média obtida das análises em triplicatas.

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos com dados da curva de calibração da substância química de referência e calculados matematicamente utilizando as equações abaixo:

Equação 1. Cálculo para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

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

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

Onde:

S = desvio padrão do intercepto das três curvas padrão;

I = inclinação média das três curvas.

Na robustez foram realizadas variações referentes a diferentes temperaturas e fluxos avaliando o impacto destas variações nas áreas obtidas. Os estudos foram realizados com diluições da solução padrão com nível de concentração de 0,180 $\mu\text{g/ml}$. As análises foram preparadas em triplicata e os dados avaliados através do desvio padrão relativo (dpr).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do ensaio

As soluções das amostras e branco (placebo) foram analisadas pelo método proposto. Nenhuma interferência dos demais constituintes foi observada no tempo correspondente ao pico do marcador cariofileno. Os dados de área e tempo de retenção do ao pico do marcador não mostraram co-eluição dos picos, indicando que o método é específico.

A identificação dos picos se baseou na comparação entre o tempo de retenção do padrão e da amostra, além da comparação entre seus espectros de massa obtidos nas mesmas condições e com o espectro de massas da biblioteca do instrumento (Wiley, 6th Edition for Class-5000 de 1999, com 229.119 espectros).

Após a otimização das condições analíticas, os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez foram avaliados.

A linearidade foi ensaiada com uma solução diluída, em hexano, de concentração entre 0,050 µg/mL à 0,450 µg/mL de β-cariofileno, realizando três repetições autênticas conforme descrito na Tabela 1. Os resultados mostrados graficamente na figura 1 apresentaram linearidade na faixa específica, onde o coeficiente de correlação não deveria ser menor que 0,99.

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi avaliada a partir de injeções em sextuplicata conforme Brasil (2003) onde a concentração utilizada foi de 0,180 µg/ml, representando o ponto médio do intervalo especificado pelo procedimento (0,050 µg/mL à 0,450 µg/mL), cujos resultados são mostrados na Tabela 2, e expressado pela média (\bar{X}_m), desvio padrão relativo (dpr). Os ensaios de precisão intermediária (precisão inter-corrída) foram realizados em dias diferentes e os valores expressos na Tabela 3. A precisão intermediária expressa os efeitos das variações entre condições diferentes. O valor do desvio padrão abaixo de 5% indica que o método tem um nível de precisão aceitável.

A recuperação, da matriz vegetal, por intermédio da adição de uma quantidade conhecida do padrão β-cariofileno ao extrato de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. A recuperação média realizada em triplicata com os resultados apresentados na tabela 4 indicam que o método tem um nível aceitável de precisão.

Através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área, foi calculado o limite de detecção e de quantificação através das equações:

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

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

Onde:

S = desvio padrão do intercepto das três curvas padrão;

I = inclinação média das três curvas.

Tendo sido obtidos os valores 0,00004 µg/ml para o limite de detecção e de 0,00012 µg/ml para o limite de quantificação. Esses resultados demonstram que o método proposto é suficientemente sensível para detectar e quantificar a amostra.

Os estudos de robustez foram avaliados através dos resultados de recuperação obtidos após as alterações dos parâmetros analíticos mostraram que é possível considerar o método robusto em relação a estes parâmetros, pois os dados mostraram uma exatidão do método na faixa de 90 – 100 %, conforme tabela 5.

Performance do equipamento

Adequabilidade do sistema

Na validação usando o software *Class -5000* (SHIMADZU, Japão) foram calculados os valores de área e tempo de retenção segundo a USP-24. O desvio padrão (dp) das replicatas de injeções da solução padrão foi calculado para as áreas de pico do marcador. Os dados de adequabilidade do sistema são mostrados na tabela 6 e indicam um nível aceitável com desvio padrão inferior a 2%.

CONCLUSÃO

Neste estudo, pode-se concluir que o presente método cromatográfico desenvolvido e validado, mostrou-se sensível, preciso, reprodutível, robusto e linear, podendo ser utilizado, portanto, para avaliação da concentração do β -cariofileno em extrações obtidas da planta *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HEDGE, I.C.; Advance in Labiate. 1992, 7 – 17.

ALBUQUERQUE, R.L.; Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: *Plectranthus barbatus* Andr. e *Plectranthus Amboinicus* (Lour) Spreng. 2000.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, P.; POLOSE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, Curitiba, V.13, p. 129-143, Jan./Dez. 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 23^a Ed. Rockville: United States. Pharmacopeial convention Inc, 1994. 2391p.

BRASIL, Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da união, poder executivo, Brasília, DF: ANVISA, 29 de maio de 2003.

LISTA DE TABELAS E FIGURA.

Tabela 1 – Linearidade do método a partir de uma solução diluída em hexano com suas respectivas áreas, médias e três repetições autênticas.

Conc. de β -cariofileno ($\mu\text{g/ml}$)	$X_m^* \pm dp^{**}$	dpr ^{***}
0,45	201926,6 \pm 2736,0	1,35
0,23	98561,0 \pm 1169,5	1,19
0,18	71092,6 \pm 1415,3	1,99
0,09	41221,3 \pm 797,1	1,93
0,05	18300,6 \pm 1812,6	9,90

* Média; ** Desvio padrão; *** Desvio padrão relativo

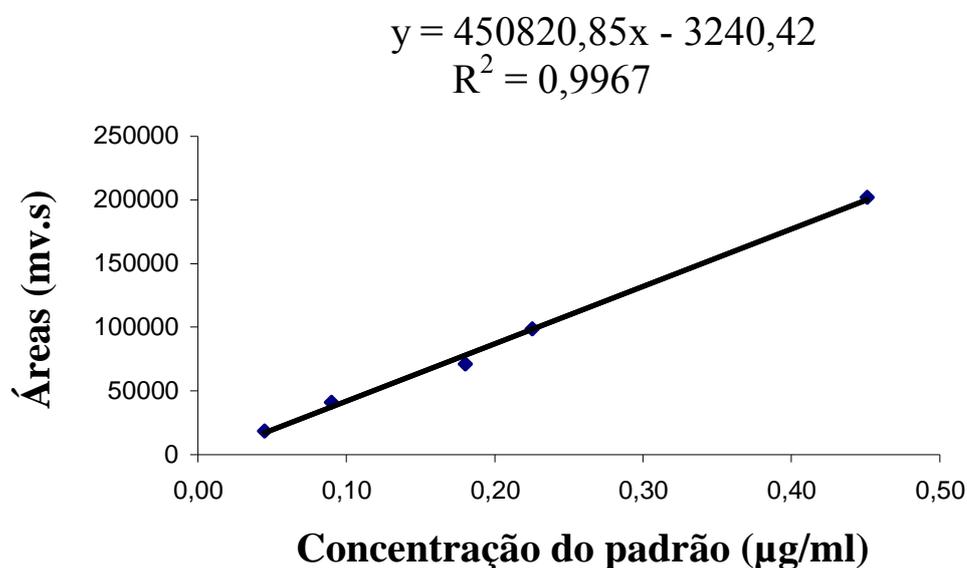


Figura 1 – Equação da reta de calibração do β -cariofileno $y = a + bx$, que mostra a relação área do pico (Y) e a concentração do padrão (X).

Tabela 2 – Ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída) com os valores médios das áreas dos picos.

Repetições	Área dos picos das amostras	Concentração (µg/ml)
1	70803	0,1803
2	70768	0,1802
3	71438	0,1819
4	71260	0,1814
5	70577	0,1897
6	70093	0,1785
Média	70823,2	0,1804
dpr (%)*	0,68	0,67

*Desvio padrão relativo

Tabela 3 – Avaliação da precisão intermediária em dias diferentes expresso em concentração de β-cariofileno.

Parâmetros	Conc. de β-cariofileno em óleos Essenciais de <i>Plectranthus amboinicus</i> (µg/ml)		
	Dia 01	Dia 02	Dia 03
Médias*	0,1759	0,1751	0,1737
dpr**	0,65	1,19	1,31

n* = 3; **Desvio padrão relativo

Tabela 4 – Resultados da análise de exatidão.

Amostras*	Concentração		Recuperação (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)	
1	0,35	0,32±0,00031	91,42±4,50
2	0,18	0,17±0,00007	94,44±4,12
3	0,06	0,05±0,00002	83,33±4,00

n* = 3

Tabela 5 – Resultados da análise de robustez.

Parâmetros	Tempo de Retenção (min.) \pm dp*	Teor médio (%) \pm dp*	dpr **
Temperatura			
detector	11,6 \pm 0,20	99,32 \pm 777,35	1,13
injetor	11,5 \pm 0,12	98,88 \pm 882,85	1,28
Fluxo da coluna	11,7 \pm 0,05	100,27 \pm 429,82	0,62

*Desvio padrão **Desvio padrão relativo

Tabela 6 – Adequabilidade do sistema cromatográfico para o β -cariofileno

Injeções	Área	Tempo de retenção
1	78807	9,786
2	75724	9,404
3	77134	9,579
4	76887	9,548
5	78583	9,759
Média	77427	9,615
dpr*	1,65	1,64

*Desvio padrão relativo.

CAPÍTULO IV

ARTIGO III

Título: Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng sob diferentes condições de cultivo.

Artigo submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia.

Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng sob diferentes condições de cultivo.

Fabiola B. Carneiro^{1*}, Irinaldo D. Júnior², Pablo Q. Lopes¹, Rui O. Macêdo²

¹Depto. de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife – PE.

²Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos – LUDEM – Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campos 1, CEP 58059-900, João Pessoa – PB.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do adubo, da irrigação, da incidência solar, do horário de coleta e da idade da planta na quantidade de β -cariofileno no óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. As plantas foram cultivadas em canteiros experimentais entre os meses de dezembro de 2006 a setembro de 2007. O substrato utilizado foi adubo orgânico (esterco bovino), adubo mineral 1 (NPK (nitrogênio, fósforo e potássio)) e adubo mineral 2 (NPK com calcário) sob diferentes tratamentos. A técnica analítica quantitativa utilizada foi à cromatografia à gás (GC/FID). De acordo com os resultados obtidos nos meses de menor precipitação de chuvas obteve-se maior rendimento de óleo essencial, e os meses de maior precipitação de chuvas mostraram uma tendência de baixos rendimentos.

Palavras-chave: sazonalidade, β -cariofileno, cromatografia gasosa.

Variation in the amount of β -cariofileno in essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng under different conditions of cultivation.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of fertilizer, irrigation, the incidence sun, the time of collection and the plant in the amount of β -cariofileno in the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. The plants were grown in experimental beds between the months of December 2006 to September 2007. The substrate was used organic fertilizer (esterco veal), fertilizer mineral 1 (NPK (nitrogen, phosphorus and potassium)) and fertilizer mineral 2 (NPK with limestone) under different treatments. The quantitative analytical technique was used to gas chromatography (GC / FID). According to the results obtained in months of lower precipitation of rainfall received

are higher yield of essential oil, and the months of highest precipitation of rain showed a trend of low income.

Keywords: seasonality, β -cariofileno, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

As espécies de *Plectranthus* (Lamiaceae) são usadas na medicina popular em várias partes do mundo (Hedge, 1992). O gênero ocorre em quatro continentes: África, América, Oceania e Ásia e estudos fitoquímicos divulgaram que diterpenos abietanos e triterpenóides são os metabólitos mais comuns no gênero. (Albuquerque, R. L., 2000).

O óleo essencial cariofileno, segundo Haslam (1996), pode ser empregado na medicina tradicional como remédio, para o tratamento de diversas moléstias orgânicas. O cariofileno apresentou as seguintes propriedades: antiedêmico (Shimizu, 1990), fagorrepelente (Keeler et al., 1991), antiinflamatória ($CI_{50} = 100 \mu M$) (Shimizu, 1990), antitumoral (Zheng et al., 1992), bactericida (Kang et al., 1992), insetífugo (Jacobson et al., 1990) e espasmolítico (Duke, 1992). Algumas destas atividades foram conferidas ao seu óxido-derivado (Shimizu, 1990; Zheng et al., 1992).

O registro de medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2004) estabelece o controle de qualidade da matéria-prima vegetal como pré-requisito essencial para a obtenção de fitoterápicos com reprodutibilidade de ação. Uma das dificuldades de se desenvolver fitoterápicos que apresentem estas características de reprodutibilidade, lote a lote, da ação terapêutica é a variabilidade no teor de constituintes majoritários, decorrente dos efeitos de sazonalidade no cultivo das plantas.

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Lindroth et al., 1987; Hartmann, 1996). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. (Kutchan, 2001). A biossíntese do óleo essencial ocorre em tricomas glandulares principalmente de folhas e cálices florais (Lawrence,

1992) e depende, além dos fatores genéticos, também dos fisiológicos e ambientais (Freitas et al., 2004).

Considerando que a quantidade dos constituintes presentes nas plantas varia consideravelmente em função de fatores externos, incluindo: temperatura, irrigação, incidência solar, nutrientes do solo, horário de coleta, idade da planta, entre outros. Faz-se necessário um estudo aprofundado destas características objetivando a qualidade da matéria-prima vegetal, garantindo a qualidade do produto final e a eficácia clínica do medicamento fitoterápico.

Neste trabalho foi estudada a relação existente entre algumas variáveis que podem estar relacionadas com a variação da quantidade de óleo essencial da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng cultivada. Foram avaliadas as influências das seguintes variáveis: incidência solar, irrigação em função do horário de coleta, estágios do desenvolvimento das plantas e diferente tipo de adubação. Para tanto foi monitorado quantitativamente por cromatografia gasosa, o óleo essencial β -cariofileno.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal (*P. amboinicus* (Lour) Spreng) foi cultivado em canteiros experimentais nas dependências do Laboratório Rabelo, no município de Cabedelo que esta inserido na unidade geoambiental dos tabuleiros costeiros que apresenta altitude média de 50 a 100 m. De modo geral, os solos são profundos e de baixa fertilidade natural. O clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco. O período chuvoso começa no outono tendo início em fevereiro e término em outubro, conforme o índice pluviométrico apresentado na tabela 1.

Uma amostra do material vegetal foi identificada, herborizada e incorporada ao acervo do Instituto de Pesquisas agropecuárias de Pernambuco.

Local de cultivo e preparo do substrato: grupos experimentais

Plantas de *P. amboinicus* (Lour) Spreng foram cultivadas em canteiros experimentais entre os meses de dezembro de 2006 a setembro de 2007. O substrato utilizado foi adubo orgânico (esterco bovino), adubo mineral 1 (NPK (Nitrogênio, fósforo e potássio)) e adubo mineral 2 (NPK com calcário), sob diferentes tratamentos.

Em cada canteiro experimental foram cultivadas 8 mudas, distribuídas em grupo de 3, cada canteiro experimental, de acordo com a tabela 2.

Coleta do material vegetal.

Foi considerada como a data de início do experimento (12 de dezembro de 2006), as coletas foram realizadas em 2 ciclos vegetativos (verão e inverno) (DAP(dias após o plantio ou idade da planta) de acordo com as datas da tabela 3.

Em cada tratamento foram coletadas as folhas de 6 mudas para a obtenção de uma amostra homogênea.

Extração do óleo essencial e determinação do tempo de extração

As plantas foram coletadas às 7h, 12h e 16h e submetidas, separadamente, à hidrodestilação em aparato de Clevenger, seguindo os parâmetro da farmacopéia brasileira IV edição, utilizando aproximadamente 60 g de material vegetal.

O tempo de extração foi determinado através da quantificação das frações hexânicas obtidas por clavenger em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas e analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID), para tanto após 7 horas de análise foi observado a não mais presença de componentes voláteis, sendo dessa forma definido o tempo de 7 horas para extração dos óleos essenciais.

Análise do óleo essencial

Quantificação do β -cariofileno.

Os estudos de quantificação foram realizados em um Cromatografo Gasoso da Shimadzu (modelo GC-17A) equipado com uma coluna capilar DB-1 dimethylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm; 0,25 micron) e detector de ionização em chama (FID) foi usado para análises das amostras. O gás de arraste foi N₂ com fluxo de 1,3 ml/min, split 1:5, temperatura do injetor 260 °C; temperatura do detector 280 °C; temperatura inicial da coluna igual a 60 °C aquecida em uma razão de 8 °C/ min até 280 °C permanecendo por 10 minutos a esta temperatura. O volume de injeção foi de 1,0 μ l.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Ciclo vegetativo 1

No período de fevereiro a maio correspondente ao ciclo vegetativo 1 de acordo com o gráfico 1 pode-se deduzir que a maior concentração de β -cariofileno em função das condições experimentais ocorreu na condição sol com irrigação alternada, seguida pelas condições sombra com irrigação alternada, sol com irrigação diária, adubo mineral 1, adubo mineral 2 e sombra com irrigação diária respectivamente.

Relacionando a melhor condição experimental (sol com irrigação alternada) em função de DAP observa-se que a maior concentração de β -cariofileno ocorreu aos 60 DAP seguida de forma decrescente por 90, 120 e 150 DAP, respectivamente. Tal fato também é observado nas demais condições.

Em relação aos diferentes horários de coleta (7, 12 e 16 horas). Os dados mostram que o horário que apresentou maior concentração de β -cariofileno relacionado a melhor condição experimental foi o das 7 horas (seguido por 16 e 12 horas respectivamente) com concentração de (0,1005 mg/ml) 60 DAP, (0,0805 mg/ml) 90 DAP, (0,0742 mg/ml) 120 DAP e (0,0444 mg/ml) 150 DAP.

B) Ciclo vegetativo 2

No período de junho a setembro correspondente ao ciclo vegetativo 2, de acordo com o gráfico 2 observa-se que a maior concentração de β -cariofileno em função das condições experimentais ocorreu na condição adubo mineral 1 (nitrogênio, fósforo e potássio (NPK)) seguido pelas condições adubo mineral 2 (NPK com calcário), sol com irrigação alternada, sol com irrigação diária, sombra com irrigação alternada e sombra com irrigação diária respectivamente. Relacionando a melhor condição experimental (adubo mineral 1) em função de dias após o plantio (DAP) observa-se que a maior concentração de β -cariofileno ocorreu aos 60 DAP seguida de forma decrescente por 90, 120 e 150 DAP, respectivamente. Tal fato, também é observado na condição adubo mineral 2. Nas demais condições observa-se que a maior concentração de β -cariofileno ocorreu aos 90 DAP seguida de forma decrescente por 120, 60 e 150 DAP, respectivamente

Em relação aos diferentes horários de coleta (7, 12 e 16 horas). Os dados mostram que o horário que apresentou maior concentração de β -cariofileno relacionado

a melhor condição experimental foi o das 16 horas (seguido pelos horários 12 e 7 horas, respectivamente) com concentração de (0,1175 mg/ml) 60 DAP, (0,1133 mg/ml) 90 DAP, (0,0799 mg/ml) 120 DAP e (0,0493 mg/ml) 150 DAP,

O gráfico 3 relaciona a concentração de β -cariofileno da condição sol irrigação alternada nos diferentes ciclos vegetativos com o índice pluviométrico em função de DAP, os dados confirmam que a produção de óleo essencial apresenta uma tendência de aumento no rendimento nos meses de baixa precipitação e baixos rendimentos nos meses de alta precipitação, com uma maior concentração de chuvas no mês de junho (Ciclo vegetativo 2/60DAP) com índice de 616,9 mm, também registrando o menor rendimento de óleo essencial (0,0541 mg/ml). Confirmando que a produção de óleo essencial é reduzida na presença de excesso de água.

De acordo com Salisbury et al.,(1991) e Bazaaz et al.,(1987), fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário.

Os efeitos da chuva na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de água do solo (Evans, 1996). Exemplos da influência do índice pluviométrico na produção de metabólitos secundários é a correlação positiva de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinifolia* (Pala-Paúl et al., 2001) e a correlação negativa entre a produção de saponinas, como a lemmatoxina em *Phytolacca dodecandra*, com os níveis de precipitação (Ndamba et al., 1994).

O efeito da seca na concentração de metabólitos é, às vezes, dependente do grau de estresse hídrico e do período em que ocorre, sendo que efeitos a curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto a longo prazo é observado um efeito oposto (Waterman; Mole, 1989; Horner, 1990; Mattson; Haack, 1987; Waterman; Mole, 1994; Medina et al., 1986).

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (Bowers; Stamp, 1993; Hendriks, 1997; Evans, 1996; Jenks et al., 1996; Wilkinson; Kasperbauer, 1972).

Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maiores taxa biossintética de metabólitos (Hartmann, 1996), tais como óleos essenciais (Hall et al.,

1986; Gershenzon et al., 1989), lactonas sesquiterpênicas (Spring; Bienert, 19870, ácidos fenólicos (Koeppel et al., 1970), alcalóides (Höft et al., 1998), flavonóides e estilbenos (Slimestad, 1998).

Duriyaprapan et al. (1986) e Tuomi et al. (1991), também afirmam que a concentração de metabólitos secundários utilizados para defesa das plantas tende a apresentar concentração inversa às taxas de crescimento, havendo então desvio de compostos do metabolismo primário (açúcares, proteínas, lipídios) para produção de metabólitos secundários, tais como os terpenóides.

Martins e Santos (1995) mencionam que, de acordo com a substância ativa da planta, existe horários em que a concentração desses princípios é maior. No período da manhã é recomendado a colheita de plantas com óleos essenciais e alcalóides, e no período da tarde, de plantas com glicosídeos.

Foi notada, por ex., uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atinge um máximo em torno do meio-dia, horário em que é responsável por 98% do óleo essencial, em contraste com uma concentração de 11% em torno de 17h (Silva et al., 1999).

Os níveis de coniina em *Conium maculatum* são maiores quando as coletas são efetuadas pela manhã que no entardecer (Fairbairn; Suwal, 1961). O conteúdo total de taxanos em *Taxus media* mostrou-se menor pela manhã, aumentando durante o dia e atingindo um máximo no final da noite (ElSohly et al., 1997).

Em relação ao ciclo vegetativo 2 observa-se que os resultados apresentados fortalecem a hipótese que entre junho e setembro, com temperaturas mais amenas, o solo com adubo mineral 1 (NPK) e adubo mineral 2 (NPK com calcário) propicia melhores condições de absorção de nutrientes do que a adubação orgânica.

De acordo com Evans (1996) a faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência no desenvolvimento da planta, afetando, portanto a produção de metabólitos secundários. De maneira geral, a formação de óleos voláteis parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levar a uma perda excessiva destes metabólitos.

Koeppel et al. (1970) demonstrou em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), um aumento de quatro a cinco vezes no conteúdo de escopolamina, ácido clorogênico e seus isômeros (compostos antioxidantes) após submissão a baixas temperaturas.

Deve-se salientar que a aplicação do adubo orgânico destina-se a melhorar as propriedades físicas (densidade, aeração e drenagem, retenção de água, etc.), químicas

(fornecimento de nutrientes, correção de substâncias tóxicas, índice de pH, etc.) e físico-químicas (adsorção de nutrientes, capacidade de troca catiônica, etc.) do solo. Participando na retenção de água e na regulação da temperatura do solo. (Manlio, 2006)

Lembrando-se que a adubação orgânica não deve ser considerada a principal fonte de nitrogênio, fósforo e potássio do sistema solo-planta, embora o mesmo contenha esses macronutrientes, porém em quantidade insuficiente para suprir as necessidades da planta. (Roberto et al., 2007)

Os adubos minerais são fornecedores de nutrientes para as plantas, embora não propiciem melhorias às propriedades físicas do solo, somente melhorando as propriedades químicas, pelo fornecimento de nutrientes.

Outro fator importante relacionado ao aumento do rendimento de óleo essencial na adubação mineral está relacionado à perda de nitrogênio por volatilização na forma de amônia, sendo menor no ciclo vegetativo 2 provavelmente em virtude das temperaturas mais baixas. (Ver tabela 1)

De acordo com Marschner, (1995); Malavolta et al. (1997), a deficiência de nitrogênio na planta está envolvida com a redução do crescimento como resultado de uma das funções que o nutriente desempenha na planta. Normalmente, o N é o nutriente mais exigido pelas culturas, uma vez que atua como estrutural nas moléculas dos aminoácidos, proteínas, enzimas, pigmentos e produtos secundários.

Correia Júnior (1994) afirma que a complementação da adubação orgânica com adubo mineral é capaz de garantir uma melhor concentração de princípios ativos na planta.

O adubo mineral 1 obteve índices maiores que o adubo mineral 2, pois, segundo Oliveira Júnior et al.,(2005) a quantidade de óleo essencial produzida é influenciada negativamente pela calagem (aplicação de calcário). Os maiores rendimentos de óleo essencial foram obtidos nos tratamentos mineral e misto (adubo orgânico com NPK) sem calagem. Dentre os tratamentos recomenda-se a adubação mista sem calagem por aliar alto rendimento de óleo essencial.

CONCLUSÃO

Os parâmetros estabelecidos permitem avaliar que em relação ao teor de β -cariofileno no óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, observa-se que nos meses de menor precipitação de chuvas obteve-se maior rendimento de óleo essencial, e os meses de maior precipitação de chuvas mostraram menor rendimento. A avaliação da quantidade de óleo essencial em diferentes horários de coleta mostrou que nos meses de menor precipitação de chuvas o melhor horário de coleta foi às 7 horas onde a planta apresentou uma maior retenção de óleo, seguido por 16 e 12 horas, respectivamente. No período chuvoso o melhor horário de coleta foi às 16 horas onde a planta apresentou uma maior retenção de óleo, seguido por 12 e 7 horas, respectivamente.

Os resultados apresentados fortalecem a hipótese que no verão (ciclo vegetativo 1) o adubo orgânico obteve melhor desempenho em relação ao rendimento de óleo essencial em virtude de sua característica termo reguladora e na retenção de água. Em temperaturas elevadas a adubação mineral é menos eficiente em relação às menores temperaturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque R L 2000. *Contribuição ao Estudo Químico de Plantas Mediciniais do Brasil: Plectranthus Barbatus Andr. e Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.*

Bazaaz F, Chiariello N, Coley P, Pitelka L 1978. *Bioscience* 1987: 37, 58. Bowers, M. D.; Stamp, N. E.; *Ecology* 1993:74.

Brasil (2004). Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 48, de 16 de março de 2004.

Duriyaprapan S et al 1986. *The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. Annals of Botany*, v.58, n.5:729-736.

ElSohly H N, Croom E M, Kopycki W J, Joshi A S, McChesney J D 1997. *Phytochem. Anal.*: 8, 124.

Evans W C. *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.

Fairbairn J W, Suwal P N 1961. *Phytochemistry*: 1, 38.

Freitas M S et al 2004. *Produção e qualidade de óleos essenciais de Mentha arvensis em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.9, 887-894.

Gershenzon J, Maffei M, Croteau R 1989. *Plant Physiol.* 89, 1351.

Gershenzon J 1984. *Rec. Adv. Phytochem.*:18, 273.

Hall G D, Langenheim J H 1986. *Biochem. Syst. Ecol.*:14, 61.

Hartmann T 1996 *Ent. Exp. Appl.*:80, 177.

Hedge I.C 1992. *Advance in Labiate.*: 7-17.

Hendriks H, Anderson-Wildeboer Y, Engels G, Bos R, Woerdenbag H J 1997. *Planta Med.*: 63, 356.

Höft M, Verpoorte R, Beck E 1998. *Planta Med.*: 64, 148.

Horner J D 1990. *Biochem. Syst. Ecol.*: 18, 211.

Jenks M A, Tuttle H A, Feldmann K A 1996. *Phytochemistry*: 42, 29.

Koeppe D E, Rohrbaugh L M, Rice E L, Wender S H 1970. *Physiol. Plant.*: 23, 258.

Kutchan T M 2001. *Plant Physiol.*:125, 58

- Lawrence, B.M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: Harley, R.M.; Reynolds, T. (Eds). *Advances in Labiatae science*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p.399-436.
- Lilov, D.; Angelova, Y.; *Biol. Plant.* 1987, 29, 34.
- Lindroth, R. L.; Hsia, M. T. S.; Scriber, J. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* 1987, 15, 681.
- Martins E R, Santos R H S 1995. *Plantas medicinais: uma alternativa terapeutica de baixo custo*. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária.
- Mattson W J, Haack R A 1987. *Bioscience*:37, 110.
- Medina E, Olivares E, Diaz M 1986. *Oecologia*:70, 441
- Ndamba J, Lemmich E, Mølgaard P 1994. *Phytochemistry*:35, 95.
- Palá-Paúl J, Pérez-Alonso M J, Velasco-Negueruela A, Palá-Paúl R, Sanz J 2001. Conejero, F.; *Biochem. Syst. Ecol.*: 29, 663.
- Salisbury F B, Ross C W 1991. *Plant Physiology*, 4th ed., Wadsworth Publishing Co.: Belmont.
- Silva M G V, Craveiro A A, Matos F J A, Machado M I L, Alencar J W 1999. *Fitoterapia*:70, 32.
- Slimestad R 1998. *Biochem. Syst. Ecol.*:26, 225.
- Spring O, Bienert U 1987. *J. Plant Physiol.*:130, 441.
- Tuomi J et al 1991. *Carbon allocation, phenotypic plasticity and induced defences*. In: Tallamy, D.W.; Raupp, M.J. *Phytochemical induction by herbivores*. New York: John Wiley:85-104.
- Waterman P G, Mole S 1989. *Insect-plant interactions*; Bernays, E. A., ed.; 1st ed., CRS Press: Boca Raton, vol. 1, cap. 4.
- Wilkinson R E, Kasperbauer M J 1972. *Phytochemistry*:11, 2439.
- Waterman P G, Mole S 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed., Blackwell Scientific Publications: Oxford, cap. 3.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Precipitação de chuvas (índice pluviométrico) e temperatura.

MÊS	PRECIPITAÇÃO (mm)*	TEMPERATURA (°C)**
Dezembro/2006	42,2	29,8
Janeiro/2007	31,7	30,0
Fevereiro/2007	162,1	30,0
Março/2007	194,0	29,9
Abril/2007	262,7	29,5
Maió/2007	224,7	28,8
Junho/2007	616,9	27,4
Julho/2007	127,8	27,3
Agosto/2007	203,1	27,0
Setembro/2007	201,2	28,0

* Fonte: EMATER.

** Fonte: Laboratório de energia solar UFPB.

Tabela 2 – Grupos experimentais.

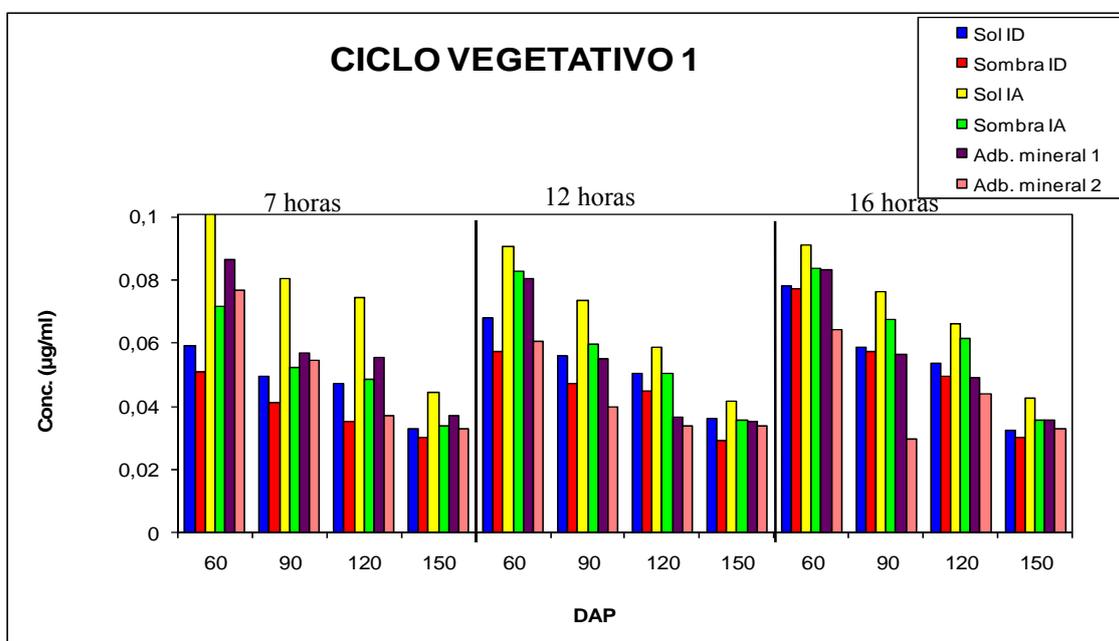
	Sol	*Sombra	Adubo orgânico	NPK	NPK c/ calcário	Irrigação diária	**Irrigação alternada
Canteiro 1	X		X			X	
Canteiro 2	X		X				X
Canteiro 3		X	X			X	
Canteiro 4		X	X				X
Canteiro 5	X			X			X
Canteiro 6	X				X		X

* Sombra = Coberto com sombrite a 50%

** Irrigação alternada = Três vezes por semana.

Tabela 3 – Período de coleta

	DIAS APÓS O PLANTIO (DAP)			
	60	90	120	150
Ciclo vegetativo 1 (Verão)	12 a 23/02/07	12 a 23/03/07	16 a 27/04/07	14 a 25/05/07
Ciclo vegetativo 2 (Inverno)	11 a 22/06/07	16 a 27/07/07	13 a 24/08/07	10 a 21/09/07

Gráfico 1 – Gráfico de estudo da sazonalidade do β -cariofileno. (Ciclo vegetativo 1).

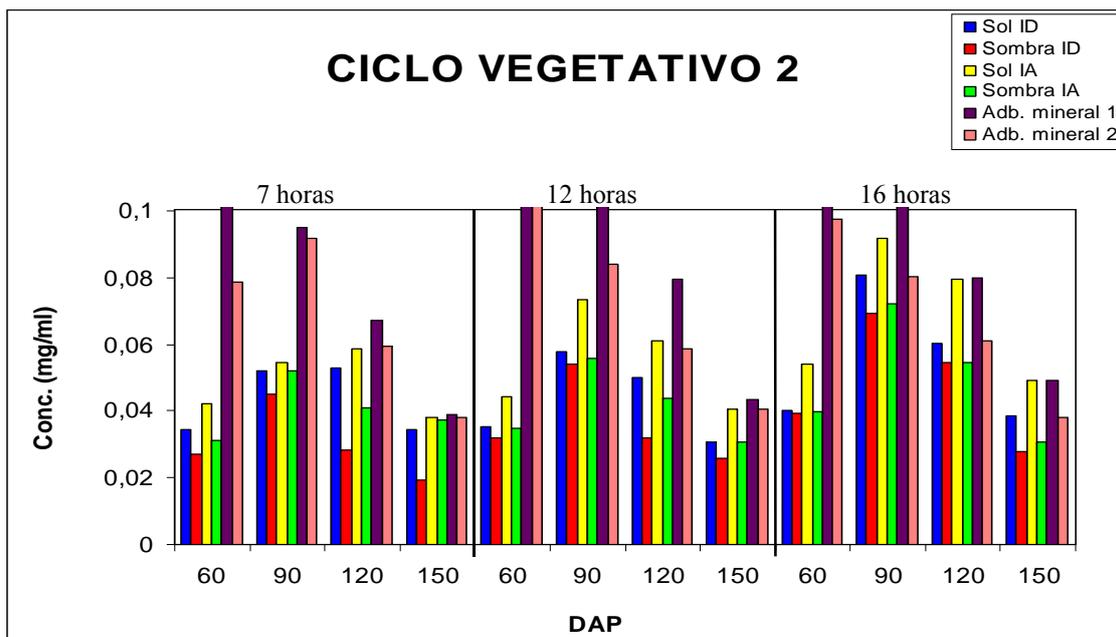


Gráfico 2 - Gráfico de estudo da sazonalidade do β -cariofileno. (Ciclo vegetativo 2).

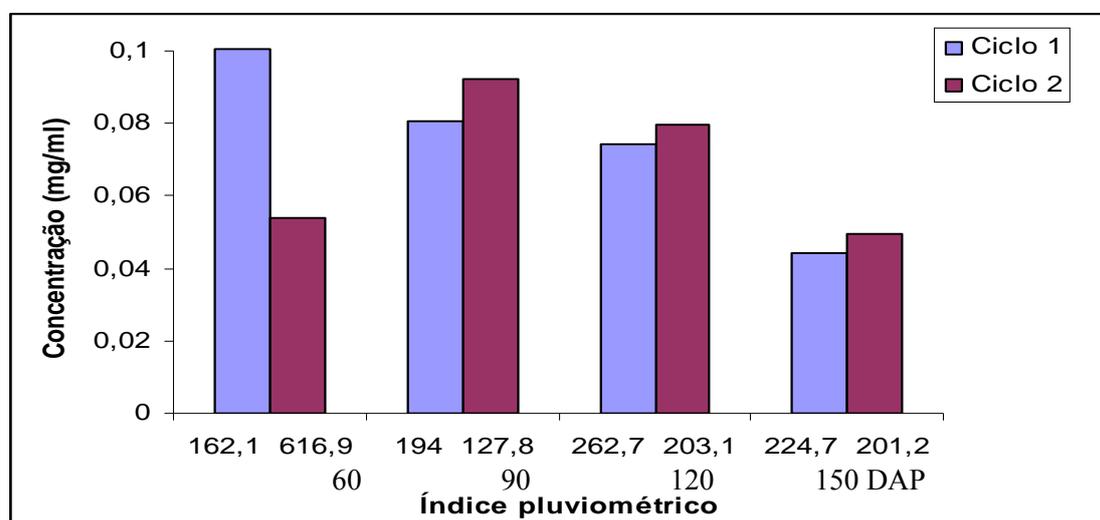


Gráfico 3 - Concentração (mg/ml) x Índice pluviométrico em função de DAP.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A revisão dos trabalhos publicados relacionados às ações farmacológicas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng demonstram o potencial medicinal da espécie justificando a grande utilização na medicina popular e a necessidade dos estudos sobre as condições de cultivo e coleta desta planta.

O desenvolvimento e validação do método cromatográfico para avaliação da concentração de β -cariofileno em extrações obtidas da planta, mostrou-se sensível, preciso econômico, reprodutível, robusto e linear.

O estudo de sazonalidade demonstrou que o rendimento do óleo essencial da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng varia com as condições de cultivo e coleta.

As condições de cultivo e coleta com menos precipitação de chuvas e coleta às 7 horas apresentaram melhor rendimento de óleo essencial quando comparados àquelas com maior precipitação de chuvas no mesmo horário.

As condições de cultivo com adubo orgânico mostraram melhor desempenho no rendimento do óleo essencial nos meses de maior incidência solar, enquanto que nos meses de maior precipitação de chuvas a adubação mineral favoreceu ao maior rendimento do óleo essencial.

O maior rendimento do óleo essencial na *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng ocorre nas condições de cultivo com menor precipitação de chuvas, adubação orgânica e coletadas 60 dias após o plantio no primeiro horário da manhã.

PERSPESTIVAS

PERSPECTIVAS

- Realizar estudos com diferentes técnicas de extração para obtenção de melhor rendimento de óleo essencial.
- Desenvolver forma farmacêutica para incorporação do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABU-IRMAILEH, B. E.; AFIFI, F. U. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 89, p. 193-197, 2003.

ALBUQUERQUE, R. L.; *Contribuição ao Estudo Químico de Plantas Medicinais do Brasil: Plectranthus Barbatius Andr. e Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng.* 2000.

ALVAREZ, E.D.A. (2004). Uso de Pirólise Acoplada à Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (Pyr-GC/MS) na Análise da Reprodutibilidade de Amostras Comerciais de *Cymbopogon Citratus* Stapf . Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2004.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *Am. J. Med.*, New York, v. 116, p. 478-485, 2004.

BRASIL, Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Guia para registro de medicamentos fitoterápicos. Diário oficial da união, poder executivo, Brasília, DF: ANVISA, 18 de março de 2004.

BRASIL, Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da união, poder executivo, Brasília, DF: ANVISA, 29 de maio de 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, F. The medicinal plants in our time. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, v. 125, n. 9, p. 322-327, 1986.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, Oxford, v. 52, p. 1361-1371, 2003.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. (1997). Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas-SP: UNICAMP.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 76, p. 1-17, 2004.

DEVIENNE, K.F., RADDI, M.S.G., POZETTI, G.L., Das plantas Medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v.6, n.3, p 11-14, 2004.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies? *J. Ethnopharmacol.*, Clare, v. 75, p. 141-164, 2001.

FENNELL, C. W.; LIGHT, M. E.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *J. Ethnopharmacol.*, Clare, v. 95, p. 113-121, 2004.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORREA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R. E TOMASSINI, T. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicações/padct/bio/cap10/Eloi.html>>. Acesso em: 12 fev. 2003.

GIVEON, S.M.; LIBERMAN, N.; KLANG, S.; KAHAN, E. Are people who use “natural drugs” aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? *Patient Educ. Couns.*, Princeton, v. 53, p. 5- 11, 2004.

HARRIS, D.C. (1998). *Quantitativa Chemical Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company.

HONG, D.D.; SHAH, M. Development and validation of HPLC stability-indicating assays. In: CARTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. (Ed). *Drug stability. Principles and Practices*. 3 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2000. V. 107, 773p.

ICH. International conference on harmonization. Validation of analytical procedures: Methodology. Q2B. 1996. 8p.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. *Rev. Bras. Farmacognosia*, São Paulo, v. 1, p. 1-7, 1996.

MAHADY, G. B. Global Harmonization of Herbal Health Claims. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 131, p. 1120S-1123S, 2001.

MARQUES, L. C. Vigilância de fitoterápicos - I: o caso da arnica. *Rev. Bras. Farmacogn.*, São Paulo, v. 1, p. 8-19, 1996.

MEDEIROS, F.D. (2006b). Determinação da Variabilidade Sazonal de Marcadores Químicos de Plantas de Interesse Medicinal. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2006.

MIGLIATO, K. F. et al.. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(1): 94-101, Jan./Mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2007000100018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 Out 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

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

ROUESSAC, F. & ROUESSAC, A. (2000). *Chemical Analysis: Modern Instrumental Methods and Techniques*. French: Jonh Wiley & Sons, LTD.

SANTOS, P.R.V., OLIVEIRA, A.C.X., TOMASSINI, T.C.B., Controle microbiológico de produtos fitoterápicos, *Rev. Farm. Bioquím.*, vol. 31, n°1, p 35-8, jan/jun., 1995.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requeriments of the US Food and Drug Administration, the USA.

Pharmacopoeia and the International Conference ion Harmonization. *Journal of Chromatography A*, n 987, p. 57-66, 2003.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Method Validation. In: *Analytical Method Development and Validation*. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1997.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 23^a Ed. Rockville: United States. Pharmacopeial convention Inc, 1994. 2391p.

YUNES, R.A., PEDRASA, R.C., FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*, Vol 24, No. 1, 147-152, 2001.

WILLARD, H., MERRITT, L.L., DEAN, J.A. & SETTLE, F.A. (1992). *Métodos Instrumentales de Análisis*. Rio Ganges – México, D.F. 455-459.