



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE-DAD,  
TERMOGRAVIMÉTRICAS E MORFO-ANATÔMICAS DE  
AMOSTRAS COMERCIAIS DE *Echinodorus macrophyllus*  
(KUNTH) MICHELI (CHAPÉU-DE-COURO)**

**Christian Barbosa de Freitas**

BELÉM- PA

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE-DAD,  
TERMOGRAVIMÉTRICAS E MORFO-ANATÔMICAS DE  
AMOSTRAS COMERCIAIS DE *Echinodorus macrophyllus*  
(KUNTH) MICHELI (CHAPÉU-DE-COURO)**

Autor: Christian Barbosa de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ilkiu Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA  
2010

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

Freitas, Christian Barbosa de, 1979 -

Análises cromatográficas por CLAE-DAD, termogravimétricas e morfo-anatômicas de amostras comerciais de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Chapéu-de-couro) / Christian Barbosa de Freitas; orientador Wagner Luiz Ramos Barbosa.-- Belém, 2010.

83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Belém, 2010.

1. Alismataceae – Controle de qualidade. 2. *Echinodorus macrophyllus* – Análise botânica. I. Barbosa, Wagner Luiz Ramos, orient. II. Título.

CDD 22.ed.: 584.72

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Christian Barbosa de Freitas

Análises cromatográficas por CLAE-DAD, termogravimétricas e morfo-anatômicas de amostras comerciais de *Echinodorus macrophyllus* (kunth) micheli (chapéu-de-couro).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Instituição: UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Carlos Emmerson Ferreira da Costa

Instituição: UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Marcieni Ataíde de Andrade

Instituição: UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Joecy Regina que nunca mediu esforços para que eu tivesse uma excelente formação.

Ao meu pai Adilson Freitas, pelo amor e apoio dado hoje e sempre.

À minha irmã Guaciara Barbosa que é um grande exemplo de competência e um espelho que reflete as melhores aspirações que eu poderia ter.

Amo todos vocês, obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me dado saúde e forças para terminar essa jornada tão árdua.

À minha namorada e amiga Aline Cruz pelo amor, apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa pela paciência, compreensão e por ter acreditado em mim.

Às minhas amigas farmacêuticas Nádia Miléo, Myrth Soares e Sarah Camelo pelo apoio dado no decorrer deste trabalho.

Ao meu amigo farmacêutico Jailton da Faculdade de Farmácia da UFPA.

À Doutora Fernanda Ilkiu pela orientação e pela simpatia a mim dispensada o que facilitou muito a realização deste trabalho.

Ao Edilson Freitas da EMBRAPA por ter contribuído para execução deste trabalho.

Ao Dr. Kleyffson Alves de Miranda, Diretor do LACEN-PA, que é um grande incentivador da pesquisa e que sem ele jamais seria possível a realização deste trabalho.

À Dâmaris Busman e Bruno de Cássio do CEP-LACEN por todo apoio dado.

Aos colegas, Lilian, Jefferson, Ana Nísia e Cristiane do setor de hepatites virais do LACEN-PA por todo apoio dado.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”.

Platão

## RESUMO

FREITAS, C. B. **ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE-DAD, TERMOGRAVIMÉTRICAS E MORFO-ANATÔMICAS DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) MICHELI (CHAPÉU-DE-COURO)**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Pará, Belém, 2010.

Para o controle de qualidade da amostra comercial de *Echinodorus macrophyllus*, foram realizadas análises botânicas, farmacognósticas e físico-químicas. Para realização dos cortes anatômicos foi reidratado, seccionado com lâmina de aço e fixado em lâminas semi-permanentes. Os cortes foram clarificados em NaClO a 20% e corados com azul-de-astra seguido de fucsina básica. Em secção transversal as epidermes são unisseriadas, com células de formatos retangulares, heterodimensionais, paredes lisas e fina cutícula. Para realização da termogravimetria foi utilizada tanto a droga quanto o extrato seco em razão de aquecimento de 5, 10 e 15 graus Celsius. A cromatografia foi feita em HPLC e a amostra utilizada foi proveniente de cromatografia em coluna e eluída por gradiente com metanol e água ácida. O tecido paliádico é constituído por duas camadas de células. As células do parênquima esponjoso têm paredes delgadas, heterodimensionais, formatos variados e espaços intercelulares bem desenvolvidos. A folha é anfiestomática com estômatos paracíticos. O pecíolo, em secção transversal, tem forma triangular a hexagonal. A epiderme é uniestratificada com células de formato poligonal, paredes lisas, grande quantidade de aerênquimas onde, algumas vezes, ocorrem diafragmas. As amostras da lâmina foliar têm características da espécie *E. macrophyllus*, porém a anatomia do pecíolo mostrou-se diferente dos descritos para a espécie, o que indica pertencer ao gênero *Echinodorus*, no entanto sugere possível contaminação do material fornecido com outras espécies vegetais. As análises termogravimétricas contribuíram bastante para estabelecer parâmetros e caracterizar a amostra.

Palavras-chave: Controle de qualidade; *Echinodorus macrophyllus*; cromatografia; termogravimetria.

## ABSTRACT

FREITAS, C. B. ANALYSIS BY HPLC-DAD CHROMATOGRAPHIC, THERMOGRAVIMETRY AND MORPHO-ANATOMY OF COMMERCIAL SAMPLES OF *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) MICHELI (CHAPÉU-DE-COURO). Master Degree Dissertation – Pharmacy Faculty, Federal University of Pará, Belém, 2010.

For quality control of the commercial sample of *Echinodorus macrophyllus* were analyzed with botanical, pharmacognostic and physical-chemical properties. To achieve the anatomical cuts was rehydrated, sectioned with steel blade and fixed on slides semi-permanent. The sections were cleared in 20% NaClO and stained with astra blue-to-follow basic fuchsin. In cross section the epidermis is uniseriate with cells of rectangular shapes, heterodimensional, smooth and thin cuticle. For realization of thermogravimetry was used both drugs as solids at a heating rate of 5, 10 and 15 degrees Celsius. The chromatography was performed in HPLC and sample was obtained from column chromatography and eluted by gradient with methanol and acidic water. The palisade tissue consists of two layers of cells. The parenchyma spongy cells have thin walls, heterodimensional, different formats and well-developed intercellular spaces. The vascular bundles are collateral. The leaf is amphistomatic with stomata paracytic. Petiole in cross section, has a triangular to hexagonal. The epidermis is uniseriate with cells of polygonal shape, smooth walls, large amounts of aerenchyma which sometimes occur diaphragms. Samples of the leaf have characteristics of the species *E. macrophyllus*, but the anatomy of the petiole showed different structures from those described for the species, which belong to the genus *Echinodorus*, however suggests possible contamination of the material supplied with other plant species. Thermogravimetric analysis contributed significantly to establish parameters and characterize the sample.

Keywords: Quality control; *Echinodorus macrophyllus*; chromatography; thermogravimetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotos das folhas (A e D); flor (B) e frutos (C) de <i>Echinodorus macrophyllus</i> .....	26
Figura 2	Estruturas químicas das chapecoderinas 1, 2 e 3 .....	28
Figura 3	Estrutura química da echinodolina A .....	29
Figura 4	Estruturas químicas das echinofilinas A e B .....	29
Figura 5	Folha rasurada da amostra comercial de <i>Echinodorus macrophyllus</i> .....	41
Figura 6	Contaminantes da amostra comercial. Elementos estranhos da amostra que deveria conter apenas folhas .....	42
Figura 7	Anatomia das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . A - corte transversal da folha mostrando a epiderme superior e parênquima paliçádico. 40X. B - corte transversal da folha mostrando a epiderme inferior e parênquima esponjoso. 40X. C e D - corte transversal da folha mostrando feixe vascular. 10X. E – Microscopia eletrônica de varredura mostrando estômato paracítico e deposição de cera .....	44
Figura 8	Anatomia do pecíolo de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . A - corte transversal do pecíolo mostrando a epiderme. 40X. B - corte transversal do pecíolo destacando a presença de canais secretores. 10X. C - corte transversal do pecíolo mostrando o formato hexagonal. 10X. D - corte transversal do pecíolo mostrando a presença de diafragmas. 40X. E - corte transversal do pecíolo mostrando a presença de diafragmas em maior aumento. 100X .....	46
Figura 9	Testes microquímicos em <i>Echinodorus macrophyllus</i> . Em A, Corte transversal do pecíolo corado com Dragendorff mostrando reação positiva para alcalóides. 10X. Em B, corte transversal da folha corada com Dragendorff mostrando reação positiva para alcalóides em aumento de 10X. Em C, corte transversal do pecíolo corado com hidróxido de potássio mostrando reação positiva para flavonóides (40X). Em D, corte transversal da folha corada com hidróxido de potássio mostrando reação positiva para flavonóides (40X). Em	

	E, corte transversal da folha corada com vermelho Sudan mostrando reação positiva para lipídios totais (40X) .....	48
Figura 10	Testes microquímicos em <i>Echinodorus macrophyllus</i> . Em A, Corte transversal da folha corada com vermelho Sudan mostrando reação positiva para lipídios totais. 40X. Em B, corte transversal do pecíolo corado com cloreto férrico mostrando reação positiva para compostos fenólicos (40X). Em C, corte transversal da folha corada com cloreto férrico mostrando reação positiva para compostos fenólicos (10X). Em D, corte transversal do pecíolo corado com reativo de Fehling mostrando reação positiva para açúcares redutores (40X). Em E, corte transversal do pecíolo corado com lugol mostrando reação positiva para amidos (40X) .....	49
Figura 11	Espectroscopia da região do Infravermelho do pó e do extrato de <i>Echinodorus macrophyllus</i> .....	52
Figura 12	Termogravimetria do pó droga 5 °C/min .....	53
Figura 13	Termogravimetria do pó da droga 15 °C/min .....	54
Figura 14	Termogravimetria do extrato seco 5 °C/min .....	55
Figura 15	Termogravimetria do extrato seco 10 °C/min .....	55
Figura 16	Termogravimetria do extrato 15 ° C/min .....	56
Figura 17	Calorimetria Exploratória Diferencial do Pó .....	57
Figura 18	Calorimetria Exploratória Diferencial do Extrato .....	58
Figura 19	Comparação das DTGs da droga .....	59
Figura 20	Cromatograma registrado a 350nm. Pico “A”, em 37,12min, apresenta espectro com máximo de absorção no U.V nos comprimentos de onda ( $\lambda$ máx.) 237 e 326 nm; O pico “B”, em 26,32min, $\lambda$ máx. 235 e 329 nm e o pico “C”, em 16,51min, $\lambda$ máx. 235 e 326 nm .....	60
Figura 21	Cromatograma da fração isolada do decocto, com destaque para o pico em 18,99min e seu espectro .....	61
Figura 22	Sobreposição dos espectros da fração isolada com tempo de retenção em 18,99min junto com o espectro do pico com tempo de retenção em 16,51min do cromatograma do decocto .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Programação da fase móvel utilizada na análise cromatográfica por CLAE .....	39
Tabela 2	Resultado dos testes microquímicos .....	47
Tabela 3	Resultado dos testes de prospecção fitoquímica .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIFITO	Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CC	Cromatografia em Coluna
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TGA	Análise Termogravimétrica
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a menos um
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milímetros
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial de Hidrogênio
%	Porcento
λ	Comprimento de Onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>A qualidade da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos</b> .....	22
<b>2.2</b>	<b>Análise térmica</b> .....	23
2.2.1	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA .....	24
2.2.3	ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL .....	24
<b>2.3</b>	<b>Família Alismataceae</b> .....	24
<b>2.4</b>	<b>Espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli</b> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Atividades biológicas</b> .....	27
<b>2.6</b>	<b>Composição química</b> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	31
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b> .....	33
4.1.1	MATERIAL VEGETAL .....	33
4.1.2	SOLVENTES .....	33
4.1.3	REAGENTES .....	33
4.1.4	REATIVOS.....	33
4.1.5	EQUIPAMENTOS .....	33
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b> .....	34
4.2.1	ANÁLISE MORFO-ANATOMIA, DO MATERIAL VEGETAL .....	34
4.2.2	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA OS TESTES MICROQUÍMICOS .....	34
4.2.3	TESTES MICROQUÍMICOS .....	35
4.2.3.1	Alcalóides .....	35
4.2.3.2	Flavonóides .....	35
4.2.3.3	Lipídios totais .....	35
4.2.3.4	Compostos fenólicos .....	35
4.2.3.5	Açúcares redutores .....	36
4.2.3.6	Amido .....	36

4.3	Determinação da distribuição granulométrica do pó de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	36
4.4	Obtenção do Decocto de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	37
4.5	Obtenção do Extrato Seco .....	37
4.6	Prospecção fitoquímica do decocto de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	37
4.7	Perfil espectroscópico na região do infravermelho do pó e do extrato seco de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	37
4.8	Obtenção do perfil térmico (TGA, DTA) do pó e do extrato seco de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	38
4.9	Obtenção das frações por cromatografia de coluna (CC) .....	38
4.10	Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência .....	39
4.10.1	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DAS FRAÇÕES .....	39
5	<b>RESULTADOS</b> .....	40
5.1	Caracterização da amostra vegetal fornecida pela empresa de insumos vegetais .....	41
5.2	Elementos contaminantes da amostra comercial .....	41
5.3	Caracterização anatômica das folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	42
5.4	Caracterização anatômica do pecíolo de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	45
5.5	Testes microquímicos realizados com as folhas e pecíolos de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	47
5.6	Resultado da distribuição granulométrica do pó de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	50
5.7	Prospecção fitoquímica do extrato seco de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Micheli .....	50
5.8	Análise na região do infravermelho para a droga em pó e do extrato seco.....	52
5.9	Termogravimetria da droga sob a razão de aquecimento de 5°C/min .....	53

5.10	Termogravimetria da droga sob a razão de aquecimento de 15°C/min ....	54
5.11	Comparação da análise termogravimétrica do extrato seco sob as razões de aquecimento de 5, 10 e 15°C/min.....	54
5.12	Análise por calorimetria exploratória diferencial da droga.....	57
5.13	Análise por calorimetria exploratória diferencial do extrato seco.....	58
5.14	Comparações das termogravimetrias derivadas sob as três razões de aquecimento .....	59
5.15	Análise cromatográfica do decocto e da fração isolada por cromatografia líquida de alta eficiência.....	60
6	DISCUSSÃO .....	63
7	CONCLUSÃO .....	68
	REFERÊNCIAS .....	70
	ANEXOS .....	79
	ANEXO A - Metodologia utilizada na prospecção fitoquímica .....	80
	ANEXO B - Laudo técnico de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunt) Mich. (Chapéu-de-couro) .....	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins de cura está cada vez mais popular por se acreditar que elas possuem apenas ações benéficas e são livres de efeitos colaterais (LOPES et al., 2000). No entanto, o uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR, 2005).

Um exemplo clássico do “perigo potencial” de determinadas plantas são os alcalóides pirrolizidínicos e seus N-óxido derivados, os quais são encontrados em milhares de espécies vegetais e podem ser genotóxicos e carcinogênicos, e, assim, representar riscos de saúde significativos para os seres humanos e animais (MEI et al., 2007).

O termo planta medicinal foi definido durante a 31<sup>a</sup> assembléia da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1978 como “aquela que administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica” sendo, na ocasião, oficialmente reconhecido (DAVID, 2004). A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. (WHO, 1998). Recentemente, a ANVISA, definiu como espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (ANVISA/2010).

Atualmente, observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Entretanto, o aumento no número de medicamentos disponíveis à população não é proporcional à qualidade dos mesmos (NASCIMENTO, 2005). Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso desses medicamentos, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES et al, 2001).

O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de US\$ 40 bilhões, enquanto que no Brasil se calcula que o faturamento esteja em torno de US\$ 1 bilhão (ABIFITO, 2007)

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada 14 de 31 de Março de 2010, entendem-se como fitoterápicos “os medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas”.

O registro de fitoterápicos é normatizado desde 1995 com a portaria número 6, que após cinco anos sofreu modificações com a publicação em fevereiro de 2000 da RDC 17 (BRASIL, 2000), quando a indústria farmacêutica passou a ter novas normas para o registro de fitoterápicos no Brasil. Desde então, o mercado nacional teve que se adequar às novas regras, de forma a garantir a qualidade, eficácia e segurança destes medicamentos. Em março de 2004, esta Resolução foi revogada pela publicação de uma nova Resolução, a RDC 48 (BRASIL, 2004). Apesar da RDC 48 trazer algumas mudanças conceituais em relação à legislação anterior, na tentativa de se adequar a outras normas de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o critério de registro para fitoterápicos não sofreu grandes alterações (RIBEIRO et al, 2005). Por fim, revogadas todas as resoluções anteriores, a RDC 14 de 31 de março de 2010 é que determina as normas para o registro de fitoterápicos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A qualidade da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos.**

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há séculos para suprir, muitas vezes, as necessidades de assistência básica em saúde da população. Nas últimas décadas, o aumento do consumo dessas espécies se deve a fatores, não só econômicos, mais ainda à procura de recursos terapêuticos integrativos e complementares. Nota-se, com isso, o incremento e a diversificação dos estudos relacionados com tais plantas. Entretanto, aspectos básicos e relevantes, como a correta identificação das espécies e a disponibilidade de descrições morfo-anatômicas, ainda, são barreiras para um eficiente controle de adulterações de diversas drogas vegetais, comprometendo a qualidade das mesmas (MILAZENE-GUTIERRE, 2003). É imprescindível, portanto, que todo o material adquirido pelos laboratórios seja analisado por profissionais capacitados, atestando a autenticidade e a qualidade da matéria-prima (FARIAS, 1985).

Dessa maneira, toda a cadeia produtiva fica comprometida, caso a realização do controle de qualidade não siga um rigoroso padrão de análise, contribuindo para a má qualidade das drogas vegetais, com conseqüente prejuízo para os medicamentos fitoterápicos com elas produzidos (MILAZENE-GUTIERRE, 2003).

Nesse contexto, a identificação de fragmentos vegetais secos, muitas vezes na forma de rasura ou de pó, é uma tarefa indispensável àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade. Os aspectos morfo-anatômicos dos órgãos e a identificação dos tecidos (parênquimas, colênquimas e tecidos condutores) ou de células características da espécie alvo, subsidiam tanto a qualidade quanto a autenticidade da amostra (MILAZENE-GUTIERRE, 2003).

As plantas medicinais constituem importantes fontes de compostos bioativos e atualmente têm sido incorporadas em diversas formulações farmacêuticas industrializadas ou manipuladas de forma magistral. A segurança e eficácia de fitoterápicos envolvem o controle de qualidade e análises físico-químicas e microbiológicas em várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final (RIBEIRO et al, 2005; NASCIMENTO, 2005).

A má qualidade de um produto fitoterápico ou droga vegetal pode vir a anular a sua eficácia e trazer riscos à saúde do usuário (MELO, 2007). Por outro lado, a

qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante da mesma (FARIAS, 2001).

De acordo com a Lei 6.360 de 1976, o Controle de Qualidade é o conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por esta Lei, que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade;

Embora existam parâmetros específicos para a produção e comércio de fitoterápicos, a fraude e a má qualidade têm preocupado profissionais da área de saúde, e a comunidade científica. A ausência de qualidade, a adulteração e a incorreta utilização, interferem na eficácia e até mesmo na segurança do produto (MELO, 2004).

Segundo a Lei 6.360 de 1976, Considera-se alterado, adulterado ou impróprio para o uso o medicamento, a droga e o insumo farmacêutico que houver sido misturado ou acondicionado com substância que modifique seu valor terapêutico ou a finalidade a que se destine; quando houver sido retirado ou falsificado, no todo ou em parte, elemento integrante de sua composição normal, ou substituído por outro de qualidade inferior, ou modificada a dosagem, ou lhe tiver sido acrescentada substância estranha à sua composição, de modo que esta se torne diferente da fórmula constante do registro; quando suas condições de pureza, qualidade e autenticidade não satisfizerem às exigências da Farmacopéia Brasileira ou de outro Código adotado pelo Ministério da Saúde.

## **2.2 Análise térmica**

Análise térmica é um termo usado para descrever técnicas analíticas que medem as propriedades físicas e químicas de uma amostra com uma função da temperatura, enquanto a substância é submetida a programa controlado de temperatura. A amostra está sujeita a uma esquema de temperatura que consiste de uma série de segmentos pré-selecionados, nos quais a amostra é aquecida ou resfriada a uma taxa constante (GIOLITO; IONASHIRO, 1988)

A análise termogravimétrica (TGA), a análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) têm sido utilizadas em estudos de controle de qualidade de matérias-primas vegetais e sintéticas. Dentre vários trabalhos publicados nessa área destacam-se, entre outros, a aplicação da termogravimetria

no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichi.) *Minispermaceae* (ARAGÃO et al., 2002). Estudo termoanalítico (TG, DTG e DSC) dos cafés *in natura* e processados (SHNITZLER et al., 2005). Estudo da determinação do grau de pureza de amostras comerciais de sacarina (SHNITZLER et al., 2005). Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais comparados com análise térmica (ARAUJO et al., 2006).

### 2.2.1 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica (TGA) é a técnica na qual a variação de massa de substância é medida, quando esta é submetida a uma programação controlada de temperatura, ou seja, é a técnica pela qual determinam perdas ou ganhos de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo (GIOLITO, IONASHIRO, 1988)

### 2.2.3 ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL

A análise térmica diferencial (DTA) registra a diferença de temperatura ( $\Delta t$ ) entre uma substância e um material de referência termicamente estável em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO, 1988; ARAÚJO, 2003)

O uso principal da DTA é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracterizá-los como endotérmicos e exotérmicos, reversível e irreversível, transição de primeira ordem ou de segunda ordem, entre outros (GIOLITO, 1988).

## 2.3 Família Alismataceae

De acordo com a classificação de Engler (JOLY, 1993), *Echinodorus macrophyllus* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Angiospermae

Classe: Monocotiledoneae

Subclasse: Magnoliidae

Ordem: Alismatales

Superordem: Liliales

Família: Alismataceae

Gênero: *Echinodorus* Rich. & Engelm

Espécie: *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli

As espécies de Alismataceae ocorrem em áreas alagadas, pantanosas e sombreadas. São também utilizadas como plantas ornamentais por possuírem folhas largas e lisas, com uma espessura razoável parecendo artificiais. Para essa finalidade, um fator determinante é o fato de se adaptarem à ambientes úmidos e sombrios (LEITE et al. 2007). Outras características sobre a família Alismataceae foram mapeadas na literatura: consiste de 13 gêneros aquáticos e semi-aquáticos, e cerca de 75 espécies, sendo que o *Echinodorus* está entre os maiores gêneros da família, com importância econômica como plantas de aquário e com distribuição natural que vai desde a Argentina até os E.U.A. (HAYNES ; HOLM-NIELSEN, 1994). Segundo Lehtonen (2009), abrange diferentes tipos de ambientes aquáticos de fluxo rápido e riachos de pântanos, lagos, savanas e florestas inundadas.

Dentre as monocotiledôneas, as Alismatales representam uma das linhagens mais antigas e, portanto, têm um papel central no estudo da evolução de caracteres de todo o grupo (LEHTONEN; MYLLYS, 2008).

#### **2.4 Espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli.**

É popularmente conhecida como chapéu-de-couro, chá-mineiro, erva-do-brejo, congonha-do-brejo e aguapé (SILVA et al., 2010).

De acordo com Leite (2007), alguns dados relevantes ainda não citados pelas Farmacopéias Brasileiras I e II, foram descritos por ele e tidos como características indispensáveis para a identificação da espécie *E. macrophyllus*, que é assim, botanicamente, descrita da seguinte forma: folha peciolada, oval, de base cordiforme e aguda ou acuminada no ápice, limbo inteiro de cor verde-escura, comprimento de 20 a 40 cm, largura de 15 a 35 cm na região próxima à base, de superfície rugosa, áspera, pedatinérvia, com 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> nervuras principais, salientes na página inferior. Pecíolo longo, coriáceo, medindo até 70 cm de comprimento, sulcado longitudinalmente e provido de estrias longitudinais (Figura 1A e 1D). Possui flores

brancas, hermafroditas, perfeitas, numerosas, dispostas em racimos, alongadas (Figura 1B) LEITE (2007), CORREA JUNIOR (1991), SILVA JUNIOR (1994).

No estudo anatômico foram observadas as seguintes características microscópicas das folhas: células epidérmicas de fase adaxial e abaxial bem regulares em tamanho e apresentando paredes sinuosas e finas; presença de pelos tectores simples, às vezes ramificados, sempre localizados na região das nervuras de ambas as fases, sendo que as células das nervuras possuem paredes finas e retas. A folha é hipoestomática, com estômato tipicamente paracítico, apresentando um par de células subsidiárias laterais ligadas às células-guardas. A nervura principal mediana é proeminente e apresenta feixes vasculares de diferentes tamanhos, todos circundados por bainha parenquimática (LEITE, 2007).

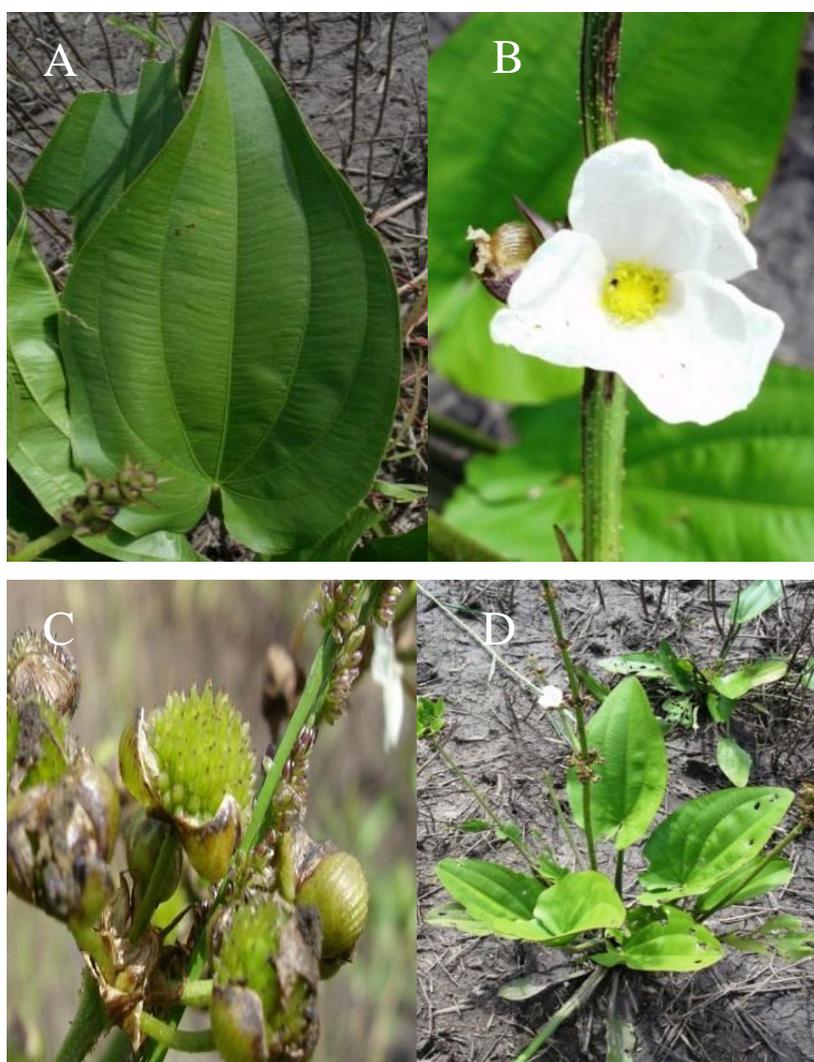


Figura 1: Fotos das folhas (A e D); flor (B) e frutos (C) de *Echinodorus macrophyllus*. Fonte [www.forum.aquaonline.com.br](http://www.forum.aquaonline.com.br)

## 2.5 Atividades Biológicas

Uma avaliação toxicológica preliminar do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* não mostrou efeito genotóxico ou parâmetros bioquímicos séricos alterados após o tratamento sub-agudo de camundongos com doses recomendadas para os seres humanos (PINTO et al., 2007).

O extrato etanólico bruto apresentou efeito anti-hipertensivo, em ratos hipertensivos, através da liberação de óxido nítrico e a estimulação dos receptores muscarínicos colinérgicos e PAF receptores. (TIBIRICÁ et al., 2007)

De forma geral, a espécie *Echinodorus macrophyllus* pode ter os seguintes efeitos: anti-reumático, depurativo, diurético, hipotensor, laxativo, litagogo, auxiliar em infecções do estômago, rins e bexiga, bem como também para o tratamento de gota, colagogo, antiinflamatório e adstringente. Essas propriedades são confirmadas pelos trabalhos de Souza e Felfili (2006), Lessa (2007) e Shigemori (2002).

Outras atividades biológicas são enumeradas para o gênero *Echinodorus*, como por exemplo, a hipotensora do alismol, um sesquiterpeno também encontrado no rizoma de *Alisma orientale*, que reduz a pressão arterial em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial, inibindo a contratilidade cardíaca (YAMAHARA et al., 1989) ou reduzindo a contratilidade vascular via ativação dos canais de voltagem de cálcio (MATSUDA et al., 1987). Além disso, extratos aquosos de folhas de *Echinodorus grandiflorus* provocam vasodilatação em anéis aórticos de coelhos, via ativação de receptor PAF, e liberação óxido nítrico endotélio dependente (TIBIRIÇÁ et al., 2007).

## 2.6 Composição Química

Os principais metabólitos identificados na planta são alcalóides, glicídeos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos (CORREA JUNIOR et al., 1991). Manns e Hartmann (1988) concluíram que o princípio ativo da planta é um diterpeno, chamado de "echinodol" (ácido echinóico), obtido do extrato metanólico de folhas secas da planta, a baixa temperatura. Mais recentemente, Tanaka (1997 apud BEVILAQUA, 2001, p. 215) concluiu que o ácido equinóico é o metabólito secundário predominante no extrato etanólico dessa planta.

Na busca de compostos bioativos de plantas medicinais brasileiras, um novo diterpenóide labdano, chapecoderina A (1), e dois novos diterpenos do tipo labdano reorganizados, chapecoderina B (2) e C (3), com um R, Alfa-insaturados, foram isolados das folhas de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). As chacoperinas se apresentam como sólidos amorfos e incolores. Abaixo as estruturas químicas das respectivas chapecoderinas 1,2 e 3.

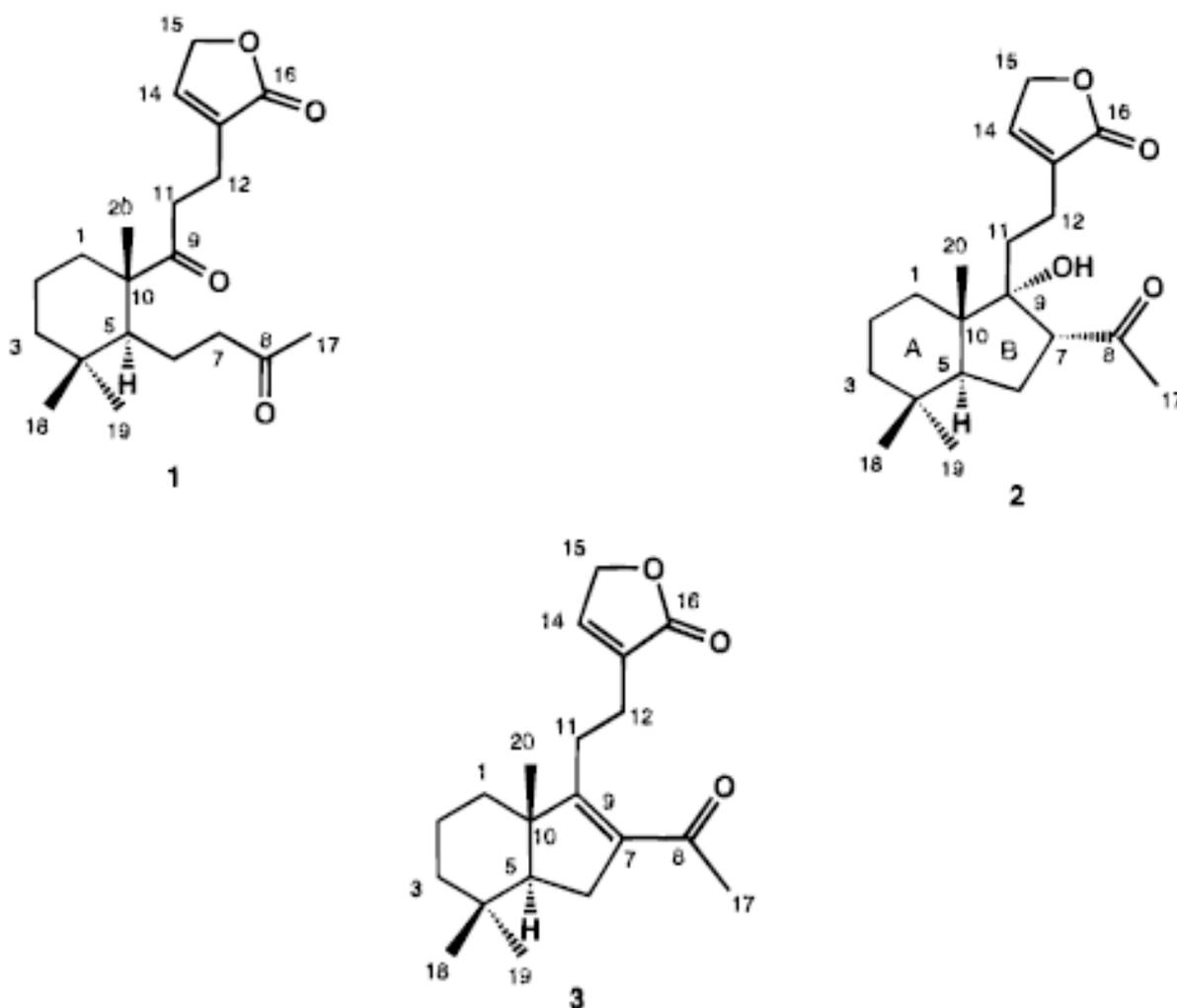


Figura 2: Estruturas químicas das chapecoderinas 1, 2 e 3.

Outras investigações levaram ao isolamento de dois novos diterpenóides tipo cembrano com um tioaldeídos no anel de lactona, sendo um deles chamado de echinodolides A (1). Assim como as chapecoderinas, se apresentam na forma de sólidos amorfos e incolores (SHIGEMORI et al., 2002).

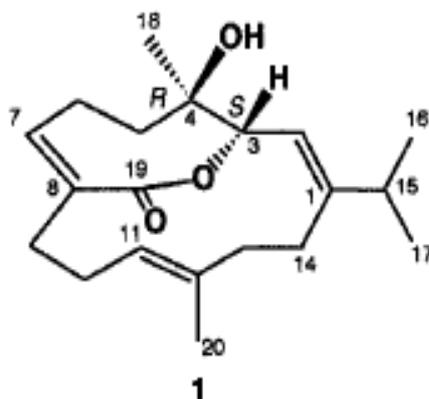


Figura 3: Estrutura química da echinodolina A.

Outros estudos mostraram novas estruturas de compostos isolados das folhas de *Echinodorus macrophyllus*, echinofilinas A (5) e B (6), com um R, Alfa-beta-insaturados e gama-lactâmicos com um anel composto por um clerodano esqueleto e uma molécula de amina (KOBAYASHI et al., 2000).

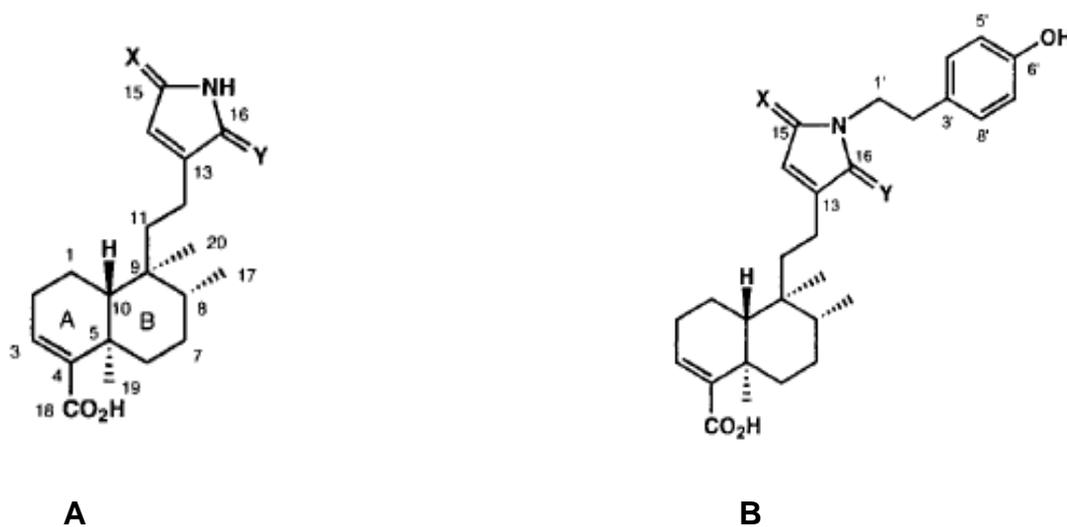


Figura 4.: Estruturas químicas das echinofilinas A e B.

Foram investigados também óleos essenciais contendo em maior quantidade o fitol, o (*E*)-cariofilleno, (*E*)- nerolidol e  $\alpha$ -humuleno (PIMENTA et al., 2006).

## **3 OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contribuir para o controle da qualidade de matéria-prima comercial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, visando respaldar a utilização desse vegetal no desenvolvimento de fitomedicamentos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Caracterização anatômica de órgãos vegetativos de *E. macrophyllus*.
- ✓ Análise microquímica para alcalóides, flavonóides, lipídios totais, compostos fenólicos, açúcares redutores e amido.
- ✓ Obtenção do perfil térmico: TGA, DSC e DTA do extrato aquoso e da droga.
- ✓ Determinação do perfil por CLAE do extrato aquoso de *E. macrophyllus*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 MATERIAL VEGETAL

O material utilizado foi obtido de um fornecedor de material vegetal e extratos, juntamente com informações técnicas contidas em um laudo.

#### 4.1.2 SOLVENTES

Álcool metílico P.A, álcool etílico P.A., éter etílico P.A da marca Synth<sup>®</sup>, Metanol em “grau HPLC” e água ultrapurificada (MilliQ<sup>®</sup>).

#### 4.1.3 REAGENTES

Ácido fosfórico a 85%, ácido acético 84%, ácido fórmico 89%, ácido sulfúrico P.A., fosfato de sódio 0,1M, solução de hidróxido de sódio 1N e 2N, solução de NH<sub>4</sub>OH à 10%, solução alcoólica de cloreto férrico a 1%, solução alcoólica de anisaldeído, solução de NP-PEG 4000, solução de nitroprussiato de sódio, solução aquosa de niidrina a 1%, solução de ácido clorídrico a 5%, solução de ácido clorídrico à 1N e 6N, solução de hidróxido de amônia à 6N, solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina à 10%, solução de anidrido acético, raspas de magnésio, peróxido de hidrogênio concentrado.

#### 4.1.4 REATIVOS

Lugol, reativo de Pascová, reativos de Fehling A e B, reativo de Bouchardm reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, reativo de Bertrand e reativo de Keede, azul de astra, fucsina básica e hipoclorito de sódio, pó de ouro.

#### 4.1.5 EQUIPAMENTOS

Balança analítica GEHAKA – BK 500 – II; câmara de luz ultravioleta com comprimento de onda 254nm e 365nm; liofilizador Virtis Freezemosile; cromatógrafo marca Merck-Hitachi; modelo LaChrom D-7000 com DAD; foto microscópio do

ZEISS modelo Axiolab, câmera digital do modelo Canon Power Shot A640, microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1450 VP, analisador térmico modelo DTG-60 e DSC-60 (Shimadzu).

## 4.2 Métodos

As análises foram realizadas nos laboratórios de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFPA, no Laboratório de Botânica da EMBRAPA e no Laboratório de Análise Térmica da Faculdade de Química da UFPA.

### 4.2.1 ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA DO MATERIAL VEGETAL

Para realização dos cortes anatômicos o material foi reidratado por 24h em água destilada e seccionados com auxílio de lâminas de aço na região do limbo foliar, da nervura central e do pecíolo.

Os cortes foram clarificados em NaClO a 20%, corados com azul-de-astrea seguido de fucsina básica (MACHADO et al., 1988), sendo posteriormente montados em lâminas com glicerina a 50% cobrindo o corte com lamínula e vedando-a com esmalte incolor ( KRAUS ; ARDUIN, 1997).

Foram obtidas fotomicrografias em foto microscópio do modelo ZEISS Axiolab acoplado a uma câmera digital do modelo Canon Pauer Shot A640, para ilustração dos caracteres anatômicos.

Para obtenção de eletromicrografias o material passou pelo processo de ponto crítico e metalização com pó de ouro, para deposição, devidamente organizados, em suportes circulares de metal (*stubs*), as imagens foram capturadas em aparelho do modelo LEO 1450 VP.

### 4.2.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA OS TESTES MICROQUÍMICOS

Os cortes do material vegetal foram feitos à mão livre com o auxílio de lâminas de aço no sentido transversal colocados em água destilada para, posteriormente, serem clarificados com hipoclorito de sódio 50% e lavados novamente com água destilada, a fim de serem transferidos para lâminas onde foi retirado o excesso de água com papel de filtro. Os reagentes referentes a cada teste

foram instilados sobre os cortes em suas respectivas lâminas, sendo o excesso retirado com papel de filtro para então finalizar a montagem na lamina com glicerina 50% cobrindo-se o corte com lamínula, vedando-a com esmalte (KRAUS ; ARDUIN, 1997).

### 4.2.3 TESTES MICROQUÍMICOS

#### 4.2.3.1 Alcalóides

O reagente de Dragendorff foi instilado sobre os cortes, aguardando-se 1 a 2 minutos para então finalizar a montagem das lâminas.

Reativo de dragendorff para histoquímica

Solução I: 8g de nitrato de bismuto  
20 mL de ácido nítrico 30%

Solução II: 22,8g de iodeto de potássio  
25 mL de água destilada

Adicionar aos poucos a solução I sobre a II, deixar em repouso durante duas horas, filtrar e completar o volume com água destilada até 100 mL (COSTA, 1982).

#### 4.2.3.2 Flavonóides

Uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 5% foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 minutos para então finaliza a montagem das lâminas (COSTA, 1982).

#### 4.2.3.3 Lipídios totais

Uma solução de vermelho Sudan foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 minutos para a montagem das lâminas (COSTA, 1982).

#### 4.2.3.4 Compostos fenólicos

Uma solução de cloreto férrico a 10% foi instilada sobre os cortes aguardando-se 1 a 2 minutos para montagem das lâminas (JOHANSEN, 1940; apud KRAUS ; ARDUIN, 1997).

Cloreto férrico

Carbonato de sódio.....	0,3g
Cloreto férrico hexidratado.....	10 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

#### 4.2.3.5 Açúcares redutores

A mistura da solução A com a B (1:1 v/v) foi instilada sobre os cortes que foram então aquecidos para em seguida serem montados sobre as lâminas (PURVIS et al, 1964; apud KRAUS ; ARDUIN, 1997).

Reagente de Fehling

Solução A	
Sulfato cúprico pentahidratado.....	3,4g
Água destilada q.s.p.....	50 mL
Solução B	
Hidróxido de sódio.....	5,0 g
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado.....	17 g
Água destilada q.s.p.....	50 mL

#### 4.2.3.6 Amido

Sobre os cortes instilou-se lugol aguardando-se 5 minutos para então realizar a montagem das lamínas (KRAUS ; ARDUIN, 1997).

### 4.3 Determinação da distribuição granulométrica do pó de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli

A amostra, triturada em moinho de facas, foi submetida à análise granulométrica em um agitador eletromagnético para peneiras. Dez gramas do pó foram submetidos à tamisação em série utilizando malhas com abertura de 1,70 mm, 1,40 mm e 710, 355, 250, 180, 125  $\mu\text{m}$ ; agitados por 30 minutos, pesando-se ao final o pó retido em cada tamis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### **4.4 Obtenção do Decocto de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli**

A extração aquosa do material vegetal em questão foi realizada baseada na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), empregando-se a decocção por 15 minutos do pó da planta em recipiente de vidro, usando-se uma proporção de 1 parte do pó para 20 partes de água.

#### **4.5 Obtenção do Extrato Seco**

Para a concentração do decocto foi utilizado um evaporador rotativo para retirada do excesso de água, sendo ao final o extrato concentrado levado à estufa em temperatura média de 40°C até total evaporação de resíduos do solvente.

#### **4.6 Prospecção fitoquímica do decocto de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli**

A prospecção fitoquímica do decocto tem por objetivo caracterizar a presença de constituintes químicos naturais como: saponina espumídica, ácidos orgânicos, açúcares redutores, heterosídeo cianogenético, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonóides, alcalóides, purinas, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados benzoquinonas; naftoquinonas e fenantraquinonas, sesquiterpenolactona e outras lactonas, esteróides e triterpenóides, carotenóides, antraquinonas, segundo a metodologia descrita em Barbosa, 2001 (ANEXO 1).

#### **4.7 Perfil espectroscópico na região do infravermelho do pó e do extrato seco de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli.**

Na análise por espectroscopia de infravermelho do pó, as bandas de absorção foram obtidas com o uso de espectrofotômetro de infravermelho FTIR (FOURRIER) marca Nicolet, modelo Protegê 460. As leituras foram realizadas em comprimento de onda na faixa 400 a 4000 $\text{cm}^{-1}$ . Quantidades apropriadas da droga foram comprimidas com brometo de potássio (KBr).

#### **4.8 Obtenção do perfil térmico (TGA, DTA) do pó e do extrato seco de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli.**

As análises termoanalíticas do pó de *Echinodorus macrophyllus* foram realizadas por termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA). Estas análises foram obtidas com um analisador térmico Shimadzu (TGA 50, DTA 50), nas seguintes condições relacionadas:

Razão de aquecimento: 5, 10 e 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}.$ ;

Peso da amostra: aproximadamente 5 mg

Faixa de temperatura: 25 – 600 $^{\circ}\text{C}.$

Atmosfera: nitrogênio

Fluxo: 25,00 mL/min.

Material da célula: alumínio.

#### **4.9 Obtenção das frações por cromatografia de coluna (CC)**

Para o isolamento das frações foi realizada uma cromatografia em coluna com o decocto, onde a fase estacionária utilizada foi o Sephadex G-10 e como eluente metanol e água na proporção de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 e 50:50, respectivamente. O critério para a mudança na proporção do eluente foi o esgotamento das bandas, ou seja, na medida em que, a primeira proporção (90:10), ao passar pelo decocto não era mais capaz de arrastar nenhuma banda, era diminuída a proporção de metanol e aumentada a de água.

Ao final, foram obtidas 315 frações que tiveram seus perfis analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), objetivando de reuni-las de acordo com suas semelhanças para poder analisá-las por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4.10 Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises das frações provenientes da CC, foi utilizado um cromatógrafo da marca MERCK-HITACHI®, modelo LaChrom 7000 com detector de UV com arranjo de diodos (CLAE-DAD) qualificado.

##### 4.10.1 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DAS FRAÇÕES

Faixa de detecção: UV 200-400nm

Fluxo: 0,8mL/min

Coluna: LiChrospher RP-8 (125 x 4.0mm)

Fase móvel: ver tabela 1

Volume de injeção: 20µL

Temperatura do forno: 26°C (+ ou – 1°C)

Tabela 1. Programação da fase móvel utilizada na análise cromatográfica por CLAE.

\*A água utilizada foi acidificada a pH 3 com ácido fosfórico.

TEMPO	SOLVENTE	
	*H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	MeOH
0 min	100	0
5 min	80	20
40 min	50	50
45 min	50	50

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra vegetal fornecida pela empresa de insumos vegetais

De um total de 2 quilos de material vegetal recebido, mais de 500 gramas eram de talos, pecíolos e outros contaminantes, além disso, esse material encontrava-se parte rasurado e/ou triturado, sem nenhuma parte inteira do vegetal ou de sua folha (Figura 5). De acordo com o laudo fornecido havia sido seco em estufa, o local de coleta foi o Estado de São Paulo, SP, e as partes enviadas para serem utilizadas para os testes de controle de qualidade foram apenas folhas.



Figura 5: Folha rasurada da amostra comercial de *Echinodorus macrophyllus*.

### 5.2 Elementos contaminantes da amostra comercial

Além das folhas, foram encontrados elementos estranhos no material vegetal analisado, semelhantes a pecíolos, porém com tamanho e formato amorfo diferenciado em relação à espécie em estudo (Figura 6A e 6B), além de elementos lenhosos e pedaços de asas de insetos.

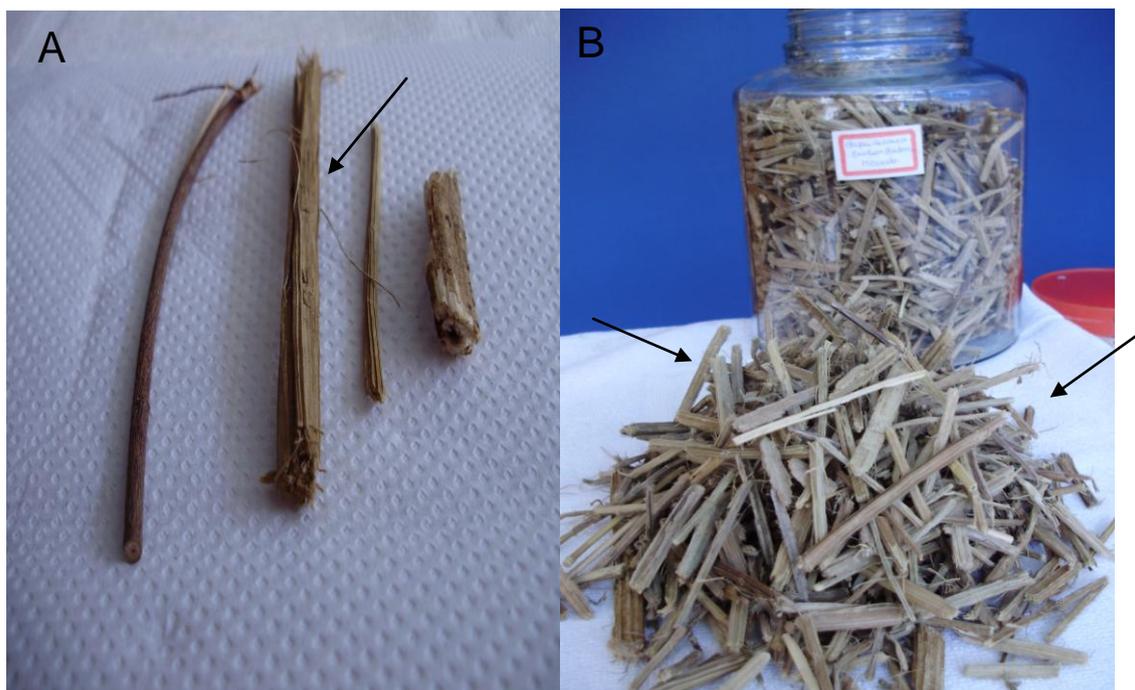


Figura 6A e 6B: Contaminantes da amostra comercial. As setas mostram os elementos estranhos da amostra que deveria conter apenas folhas.

### 5.3 Caracterização anatômica das folhas de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli

Em vista frontal as células, em ambas as faces, apresentam formato quadrangular e retangular com paredes levemente sinuosas e delgadas com deposição de cera epicuticular de aspecto granular. Em secção transversal as epidermes são unisseriadas, com células de formato retangular, heterodimensionais e parede periclinal e anticlinal lisas, além de fina deposição de cutícula (Figura 7A e 7B).

O parênquima clorofiliano é diferenciado em parênquima paliçádico no lado adaxial e parênquima esponjoso na fase abaxial da folha, ou seja, dorsiventral. O tecido paliçádico é constituído, geralmente por duas camadas de células de tamanho homogêneo, paredes anticlinais levemente sinuosas e paredes periclinais lisas, sendo a primeira camada mais organizada com células de formato alongado, justapostas e perpendicular à epiderme (Figura 7A), a segunda camada do paliçádico é constituída de células de mesmo formato, porém de tamanho diferenciado, aparentemente menor do que aquelas em contato com a epiderme. As células do parênquima esponjoso apresentam-se com paredes delgadas,

heterodimensionais e com formatos variados, além de espaços intercelulares bem desenvolvidos (Figura 7B).

Os feixes vasculares possuem xilema voltado para região superior e floema para face oposta, nas regiões polares ocorrem calotas de células esclerenquimáticas e envolvendo externamente estas estruturas há uma camada de células parenquimáticas que estendem-se até as epidermes formando projeções (Figura 7C e 7D).

A folha é anfiestomática, o complexo estomático é formado por um par de células subsidiárias laterais ligadas às células-guardas (Figura 7E), paracítico, ocorrem no mesmo nível das células do limbo.

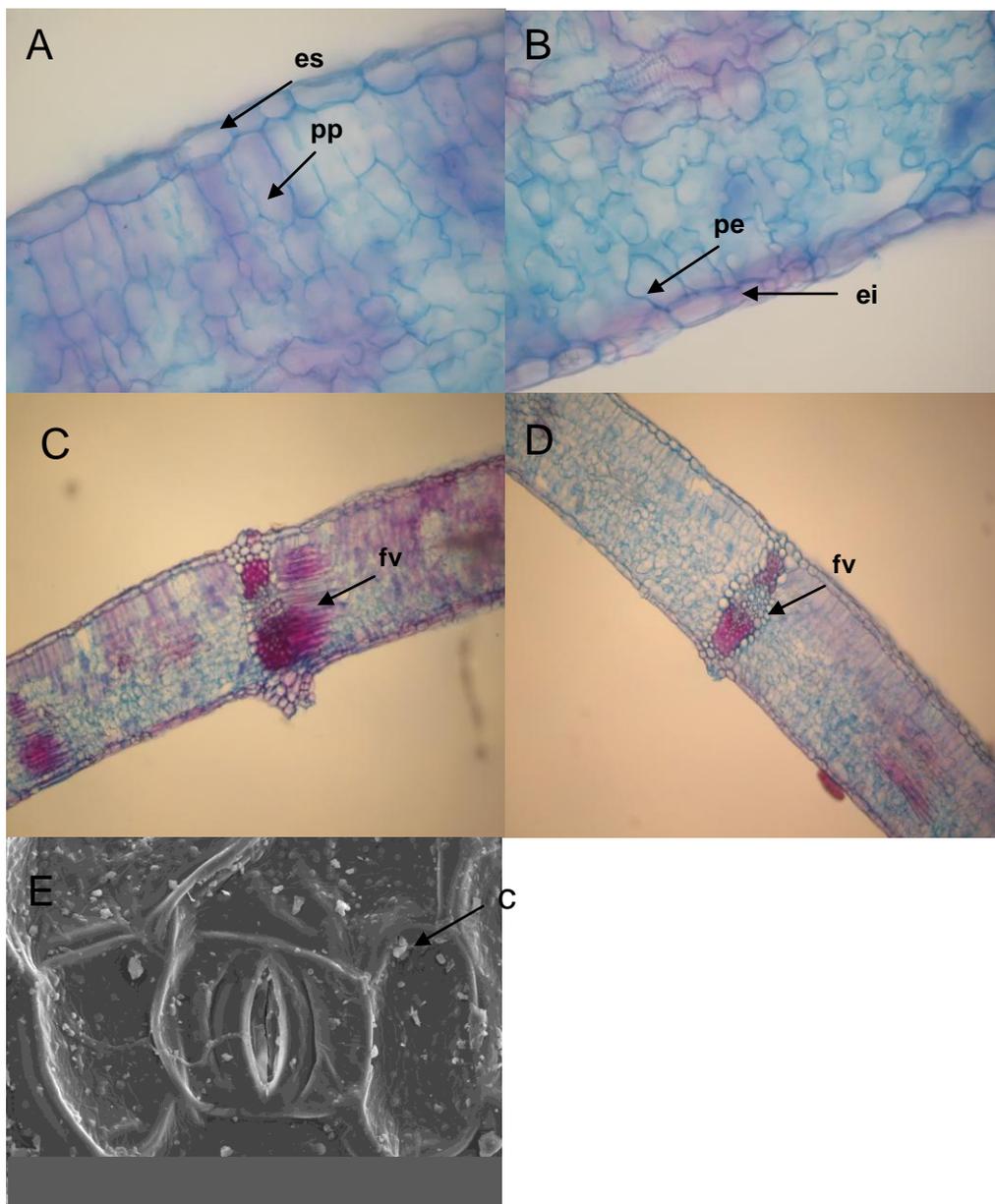


Figura 7: Anatomia das folhas de *Echinodorus macrophyllus*

A - Corte transversal da folha mostrando a epiderme superior (es) e parênquima paliçádico (pp). 40X.

B - Corte transversal da folha mostrando a epiderme inferior (ei) e parênquima esponjoso (pe). 40X.

C e D - Corte transversal da folha mostrando feixe vascular (fv). 10X.

E – Microscopia eletrônica de varredura mostrando estômato paracítico e deposição de cera (c).

#### **5.4 Caracterização anatômica do pecíolo de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli**

O pecíolo, em secção transversal, apresenta formato triangular a hexagonal com uma delgada cutícula. A epiderme é uniestratificada, apresentando células de formato poligonal, com paredes lisas (Figura 8A). Observam-se duas a três camadas de células parenquimáticas compactas, nas quais encontram-se canais secretores e feixes vasculares menos calibrosos com relação aos feixes vasculares do parênquima aerífero (Figura 8B). Este apresenta uma grande quantidade de aerênquimas formada por uma camada de células parenquimáticas isodiamétricas, onde se distribuem feixes vasculares de diferentes tamanhos (Figura 8C), os feixes apresentam canal secretor na região convexa do xilema.

Há presença de diafragmas, que são septos de células braciformes que interrompem os grandes espaços intercelulares existentes, evitando o colapso do órgão caso haja uma lesão na parte submersa da planta (Figura 8D e 8E).

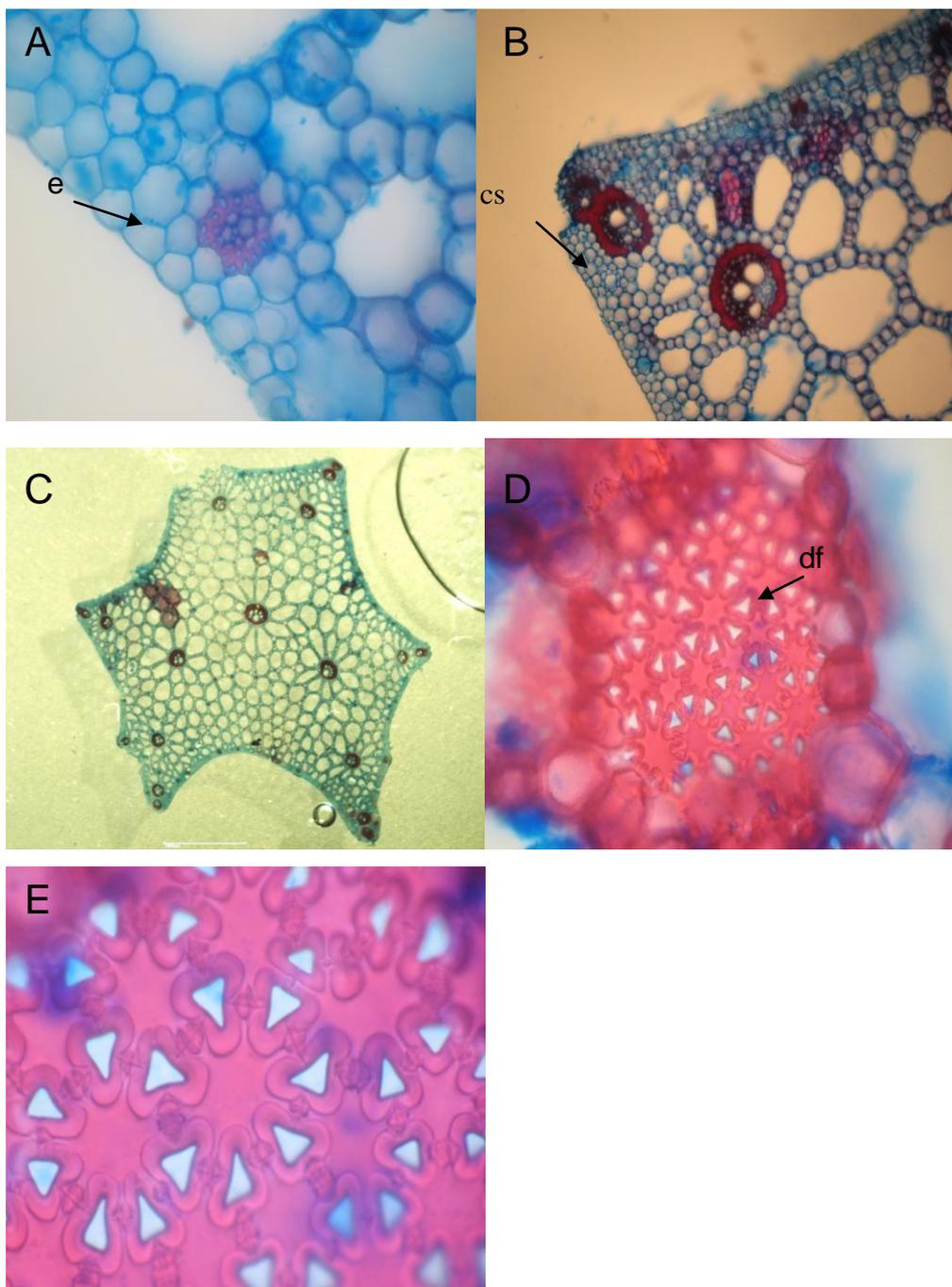


Figura 8: Anatomia do pecíolo de *Echinodorus macrophyllus*

A - corte transversal do pecíolo mostrando a epiderme (e). 40X.

B - corte transversal do pecíolo destacando a presença de canais secretores (cs). 10X.

C - corte transversal do pecíolo mostrando o formato hexagonal. 10X.

D - corte transversal do pecíolo mostrando a presença de diafragmas (df). 40X.

E - corte transversal do pecíolo mostrando a presença de diafragmas em maior aumento. 100X.

### 5.5 Testes microquímicos realizados com as folhas e pecíolos de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli

Os testes microquímicos foram positivos para todos os marcadores investigados (Tabela 2). As reações dos corantes com material vegetal podem ser visualizadas nas Figuras 9 e 10.

Tabela 2 : Resultado dos testes microquímicos

<b>TESTE</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>FIGURA</b>
Alcalóides	Positivo	9A e 9B
Flavonóides	Positivo	9C e 9D
Lipídios Totais	Positivo	9E e 10A
Compostos fenólicos	Positivo	10B e 10C
Açúcares redutores	Positivo	10D
Amido	Positivo	10E

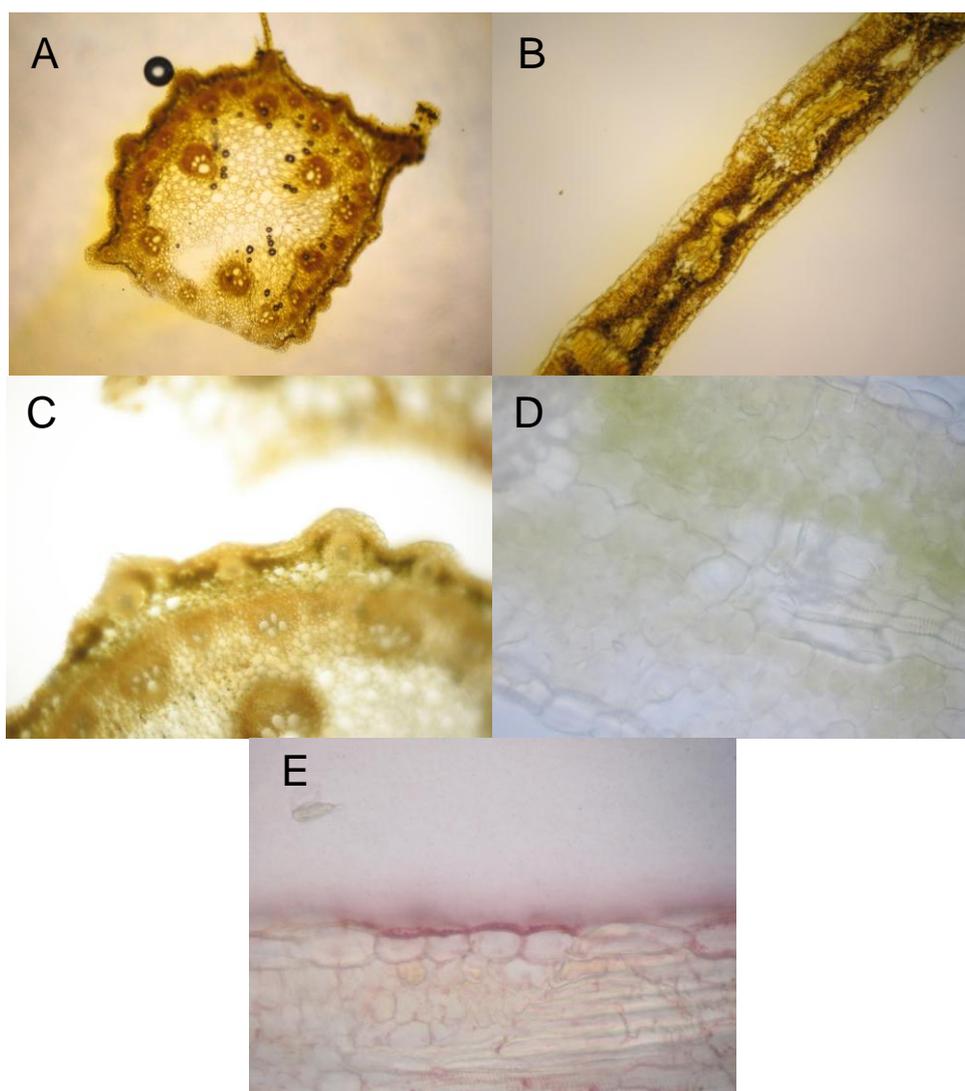


Figura 9: Testes microquímicos em *Echinodorus macrophyllus*.

A – Corte transversal do pecíolo corado com Dragendorff mostrando reação positiva para alcalóides. 10X.

B – Corte transversal da folha corada com Dragendorff mostrando reação positiva para alcalóides. 10X.

C – Corte transversal do pecíolo corado com hidróxido de potássio mostrando reação positiva para flavonóides. 40X

D – Corte transversal da folha corada com hidróxido de potássio mostrando reação positiva para flavonóides. 40X.

E – Corte transversal da folha corada com vermelho Sudan mostrando reação positiva para lípidios totais. 10X.

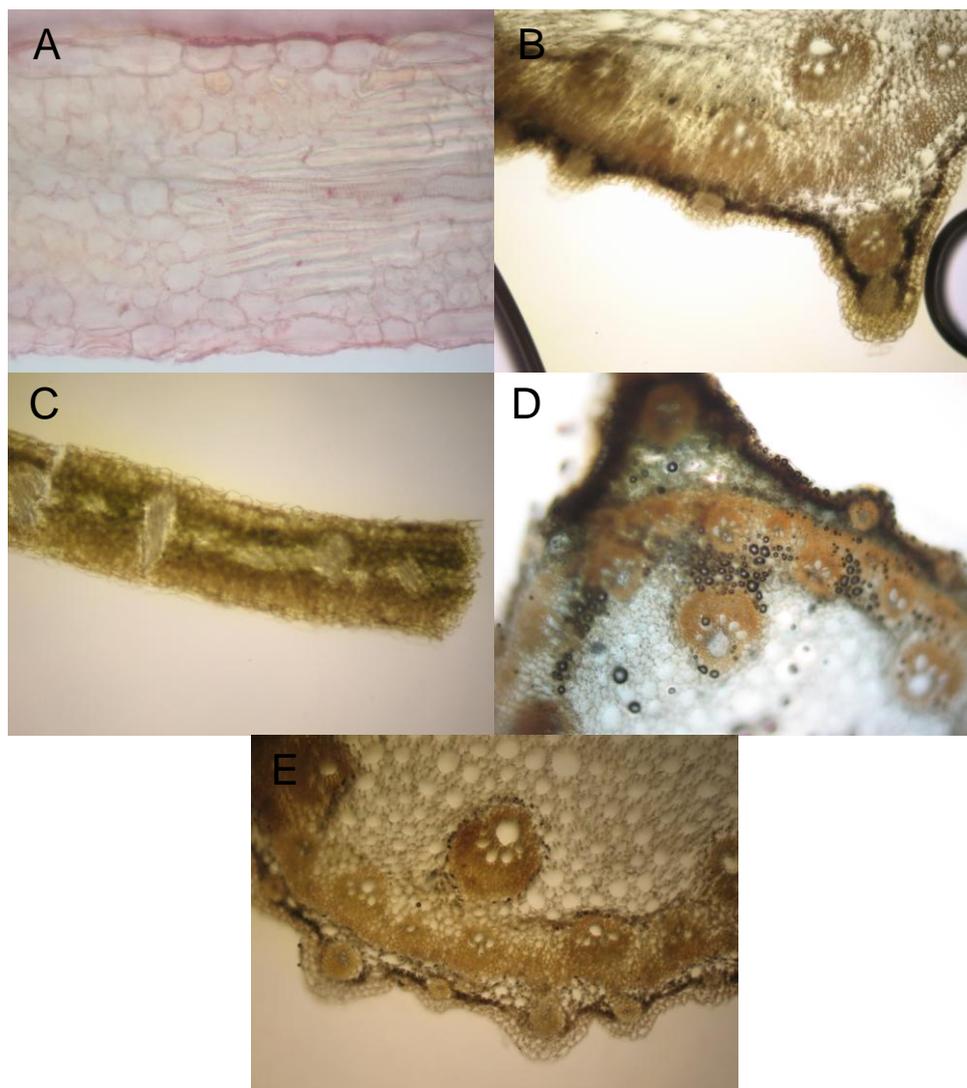


Figura 10: Testes microquímicos em *Echinodorus macrophyllus*.

A - Corte transversal da folha corada com vermelho Sudan mostrando reação positiva para lipídios totais. 40X.

B – Corte transversal do pecíolo corado com cloreto férrico mostrando reação positiva para compostos fenólicos. 40X.

C – corte transversal da folha corada com cloreto férrico mostrando reação positiva para compostos fenólicos. 10X.

D – Corte transversal do pecíolo corado com reativo de Fehling mostrando reação positiva para açúcares redutores. 40X.

E – Corte transversal do pecíolo corado com lugol mostrando reação positiva para amidos. 40X.

### **5.6 Resultado da distribuição granulométrica do pó de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli**

No teste realizado segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988), após a tamisação do pó da amostra de *E. macrophyllus*, apresentou como resultado a passagem das partículas em sua totalidade pelo tamis com abertura de malha de 1,70mm e menos de 40 por cento passaram pelo tamis de malha 355µm, caracterizando-o como pó grosso.

### **5.7 Prospecção fitoquímica do extrato seco de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli**

A tabela 3 mostra os resultados da prospecção fitoquímica, sendo que as classes de metabólitos que reagiram tendo como resultados positivos foram os ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, esteroides e triterpenóides, fenóis e taninos e saponinas.

Tabela 3: Resultado dos testes de prospecção fitoquímica.

<b>CLASSE DE METABÓLITOS</b>	<b>DECOCTO</b>
Ácidos orgânicos	+
Açúcares redutores	+
Azulenos	-
Alcalóides	+
Antraquinonas	-
Benzaquinonas; Naftoquinonas e Fenantraquinonas	-
Carotenóides	-
Catequinas	-
Esteróides e Triterpenóides	+
Fenóis e Taninos	+
Flavonóides	-
Glicosídeos Cardíacos	-
Heterosídeo Cianogenético	-
Polissacarídeos	-
Proteínas e Aminoácidos	-
Purinas	-
Saponina	+
Sesquiterpenolactona e outras Lactonas	-

## 5.8 Análise na região do infravermelho para a droga em pó e do extrato seco

A figura 11 mostra as bandas presentes tanto na amostra do pó da droga seca como no extrato.

Observa-se que há um aumento da intensidade das bandas do pó para o extrato. A banda a  $3290\text{ cm}^{-1}$  está presente nos dois espectros e é correspondente as vibrações de estiramento O–H por associações poliméricas característica de alcoóis, fenóis e água.

Em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  a  $2355\text{ cm}^{-1}$ , tem-se as bandas correspondentes a carboxila (COO – H) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). A  $1021\text{ cm}^{-1}$  surge uma banda que é característica de substâncias que apresentam enxofre, correspondendo a presença de ácidos sulfônicos.

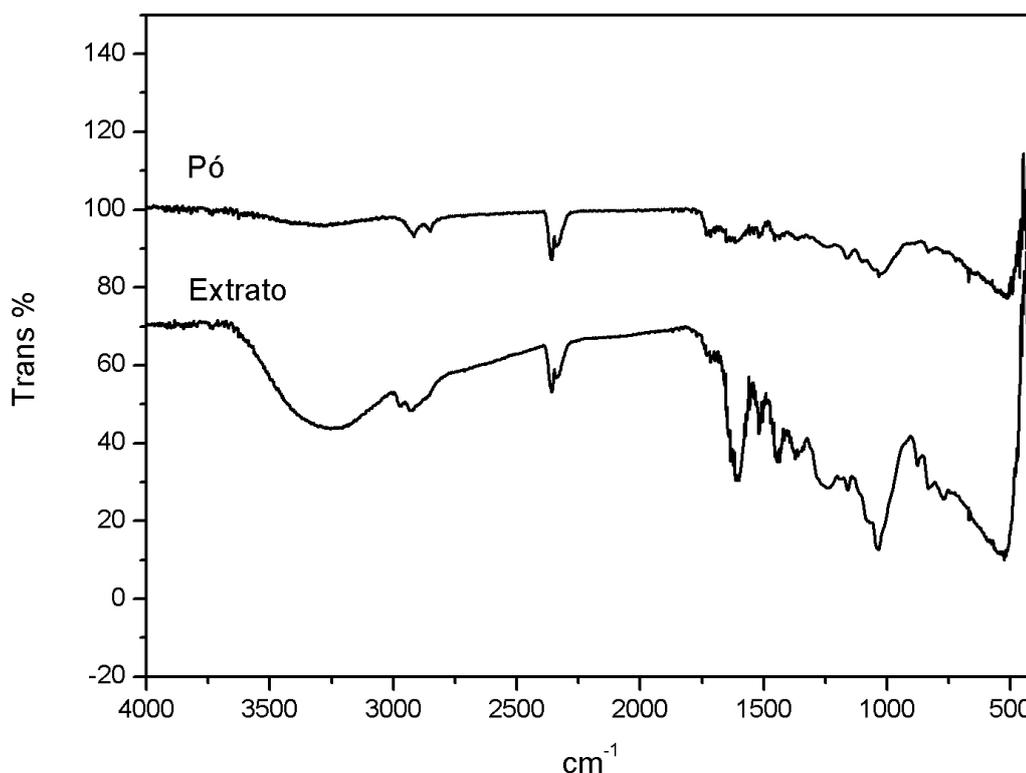


Figura 11: Espectroscopia da região do Infravermelho.

### 5.9 Termogravimetria da droga sob a razão de aquecimento de 5°C/min

A figura 12 mostra a curva de TG para o pó da droga feita a 5°C/min mostra que aparentemente até 650°C ocorrem três perdas de massa, com ligeira estabilidade entre elas. Para melhor visualizar essas perdas de massa torna-se necessário a utilização da derivada da massa, que é a DTG onde as perdas podem ser visualizadas mais nitidamente. Observando-se a DTG pode-se perceber a primeira perda que ocorre até 100°C correspondente a perda de água e umidade.

Entre 200 e 350°C surge um pico de alta intensidade indicando um conjunto de reações pequenas que ocorrem durante ou próximo de uma reação principal. A terceira perda de massa pode estar relacionada a uma possível cristalização de metais ou oxalatos presentes na amostra (Figura 12).

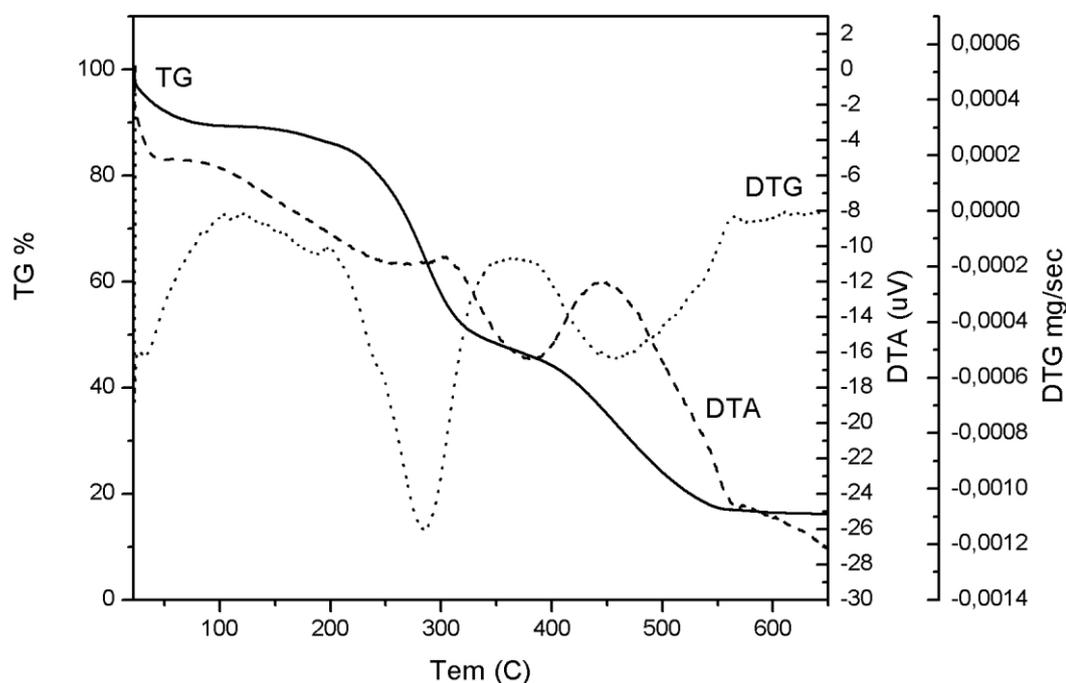


Figura 12: Termogravimetria do pó da droga 5 °C/min.

### 5.10 Termogravimetria da droga sob a razão de aquecimento de 15°C/min

Em geral pode-se dizer que o aumento da razão de aquecimento diminui a possibilidade de detecção de fases intermediárias. Na figura 13, notam-se pela DTG três perdas de massa bem definidas. Pode-se ver também que a razão de aquecimento influencia diretamente as curva DTA.

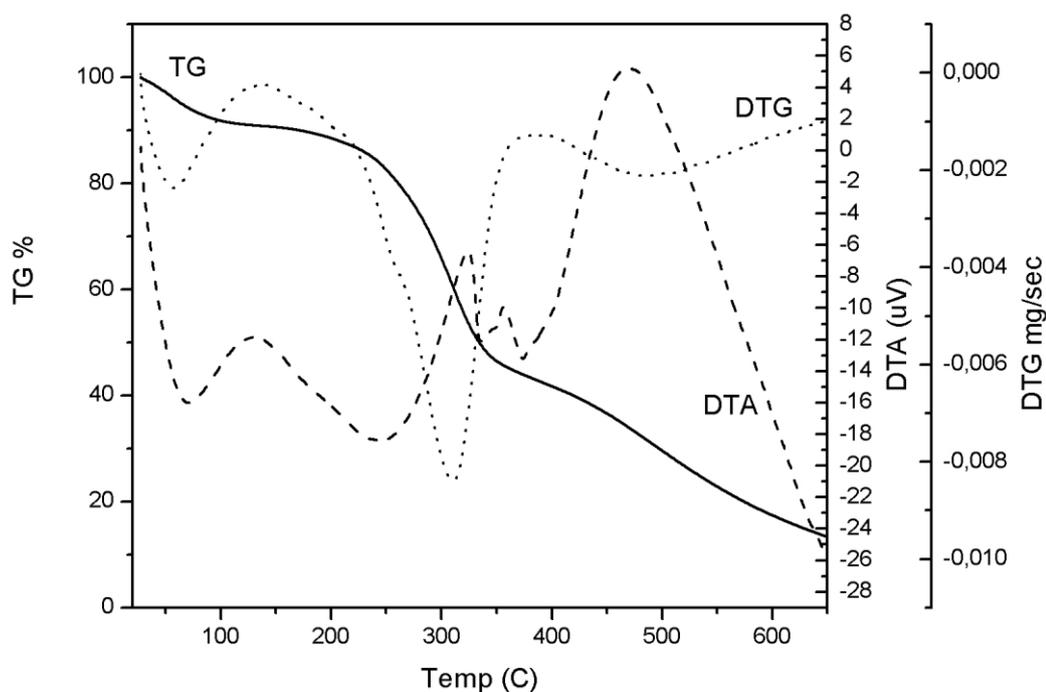


Figura 13: Termogravimetria do pó da droga 15 °C/min.

### 5.11 Comparação da análise termogravimétrica do extrato seco sob as razões de aquecimento de 5, 10 e 15°C/min

As variações da curva DTG indicam duas perdas de massa, sendo que entre 100 e 350°C observa-se uma perda que se divide em duas principais e várias reações rápidas correspondendo a saída dos componentes do extrato (Figuras 14, 15 e 16).

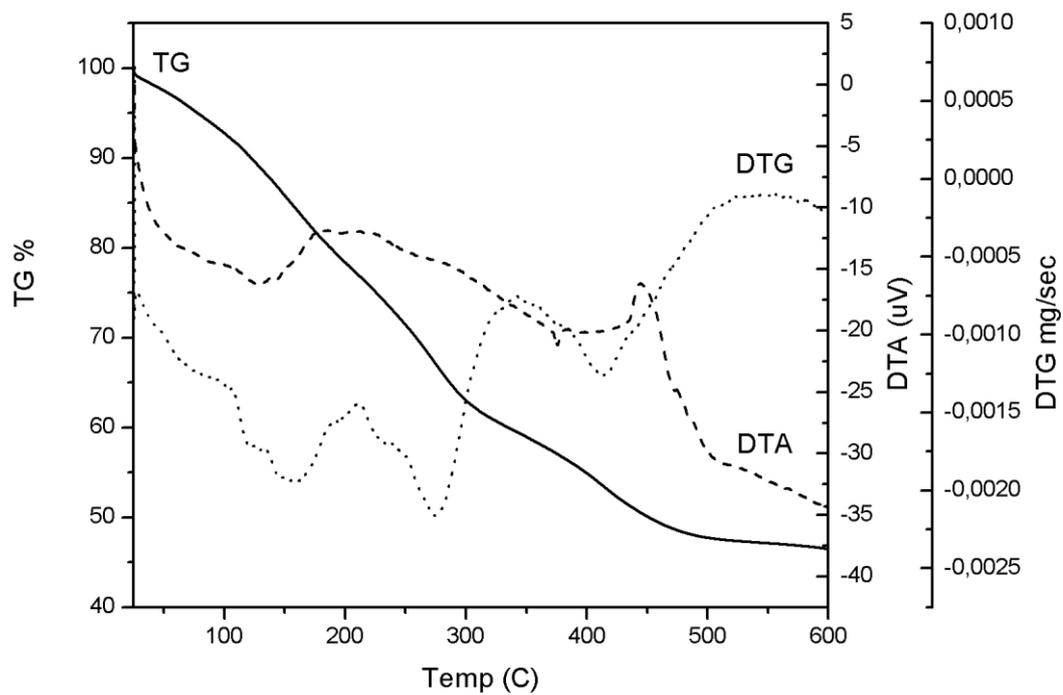


Figura 14: Termogravimetria do extrato seco 5 °C/min.

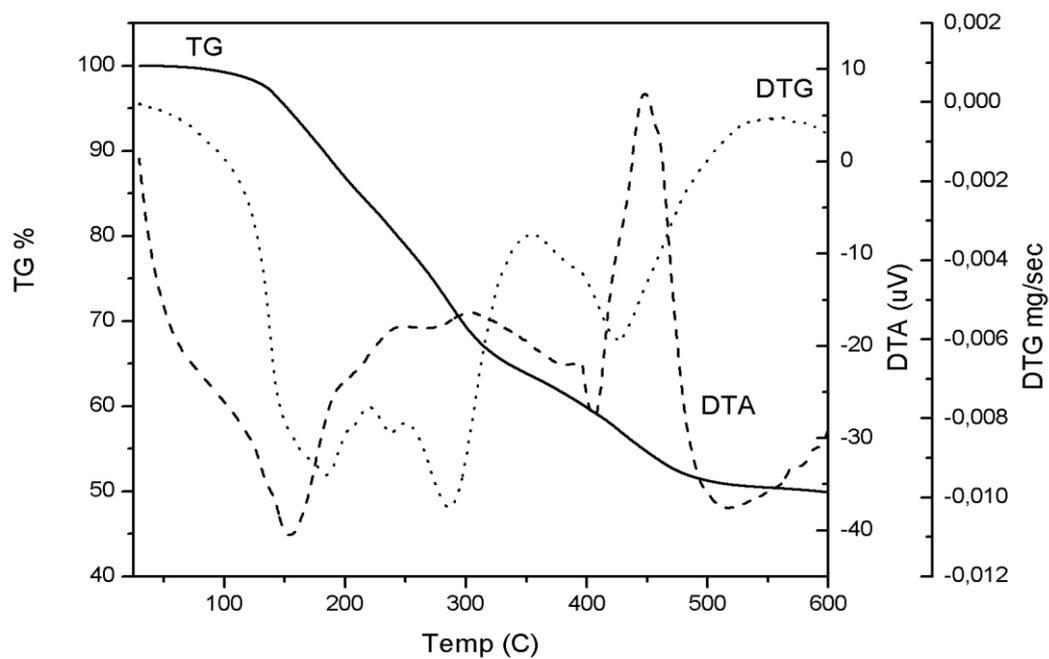


Figura 15: Termogravimetria do extrato seco 10 °C/min.

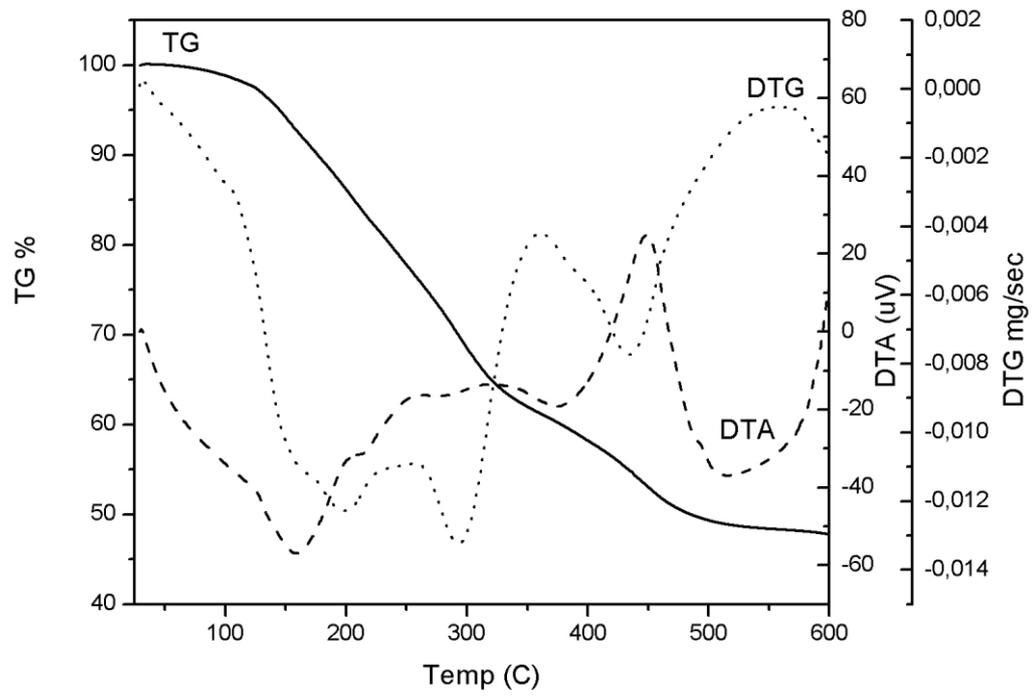


Figura 16: Termogravimetria do extrato 15 ° C/min.

### 5.12 Análise por calorimetria exploratória diferencial da droga

Para as análises de DSC do pó da droga, a amostra analisada a 15°C apresentou um pico nítido em torno de 115°C (Figura 17).

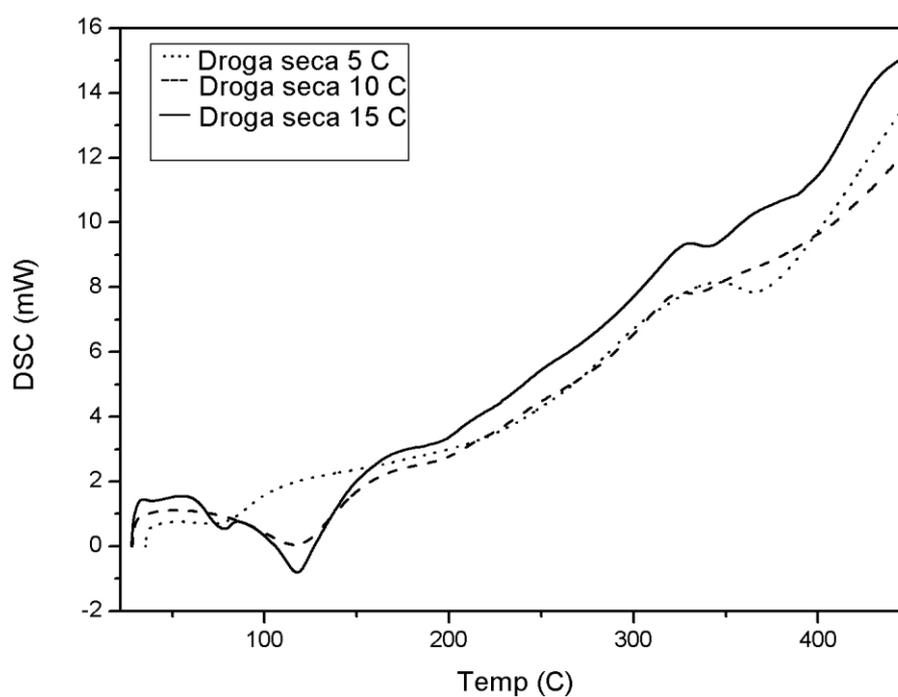


Figura 17: Calorimetria Exploratória Diferencial do Pó.

### 5.13 Análise por calorimetria exploratória diferencial do extrato seco

Pelas análises de DSC pode-se notar que a presença de água só ocorreu em uma análise. Entre 150 e 300°C pode-se observar um conjunto de picos endotérmicos e exotérmicos correspondentes a decomposição dos materiais que estão em maior proporção (Figura 18).

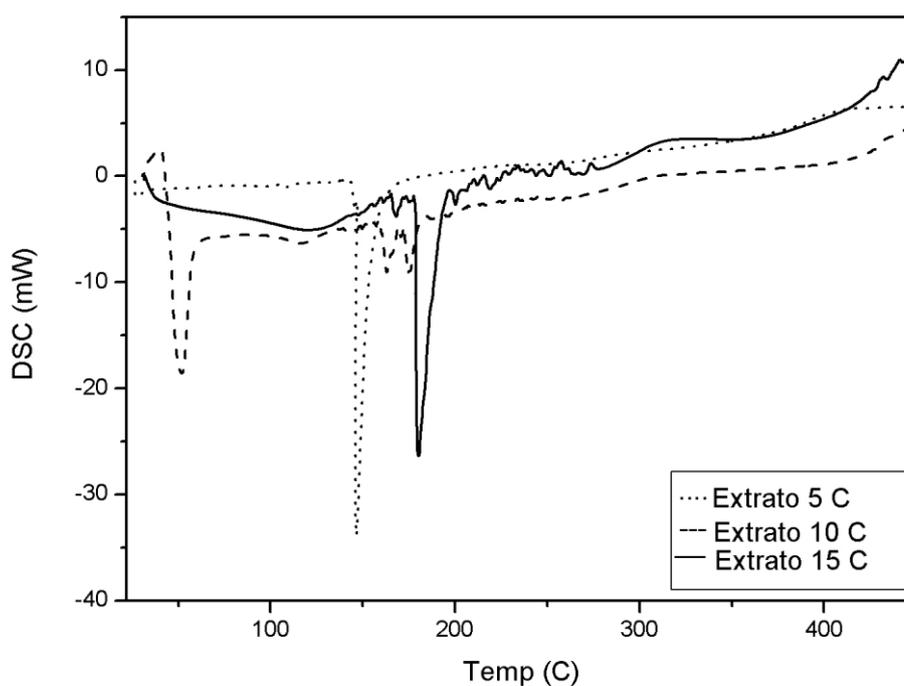


Figura 18: Calorimetria Exploratória Diferencial do Extrato.

### 5.14 Comparações das análises termogravimétricas derivadas sob as três razões de aquecimento

Na figura 19 pode se observar que o aumento da razão de aquecimento torna as perdas de massa mais nítidas e mais intensas.

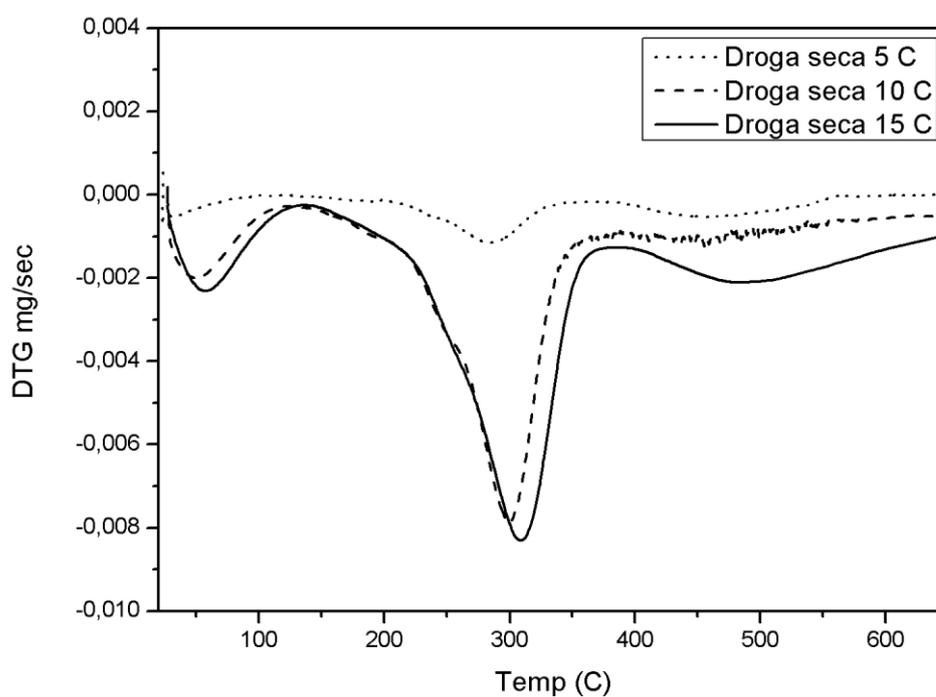


Figura 19: Comparação das DTGs da droga.

### 5.15 Análise cromatográfica do decocto e da fração isolada por cromatografia líquida de alta eficiência

A figura 20, apresenta o perfil cromatográfico do decocto onde se podem visualizar os espectros dos picos com maior intensidade e seus respectivos tempo de retenção.

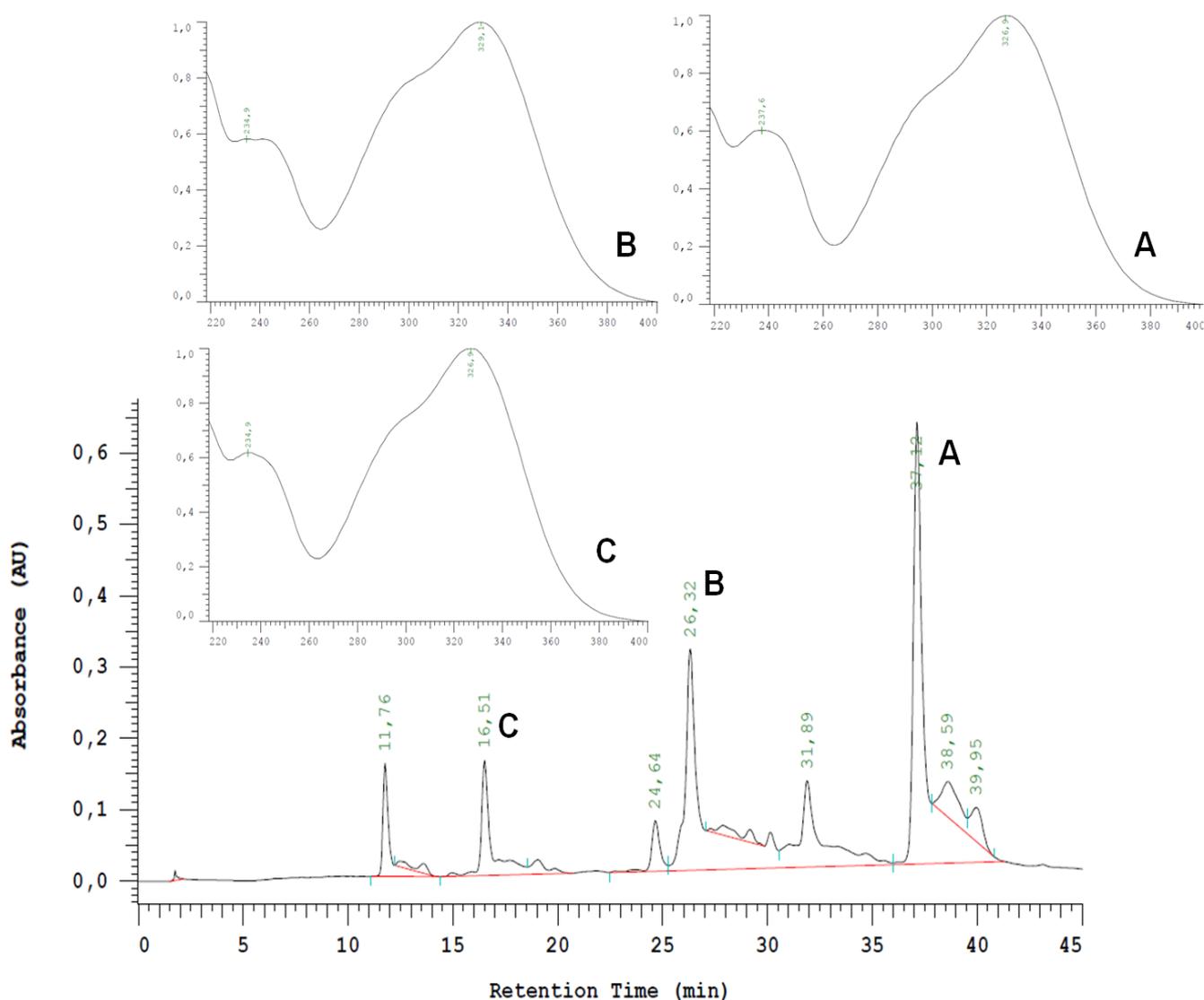


Figura 20: Cromatograma registrado a 350nm. Pico "A", em 37,12min, apresenta espectro com máximo de absorção no U.V nos comprimentos de onda ( $\lambda$  máx.) 237 e 326 nm; O pico "B", em 26,32min,  $\lambda$  máx. 235 e 329 nm e o pico "C", em 16,51min,  $\lambda$  máx. 234 e 326 nm.

Na figura 21, observa-se o pico de interesse em 18,99min, registrado a 350nm e seu respectivo espectro cujo comprimento de onda máximo ( $\lambda$  máx.) é de 326,9nm.

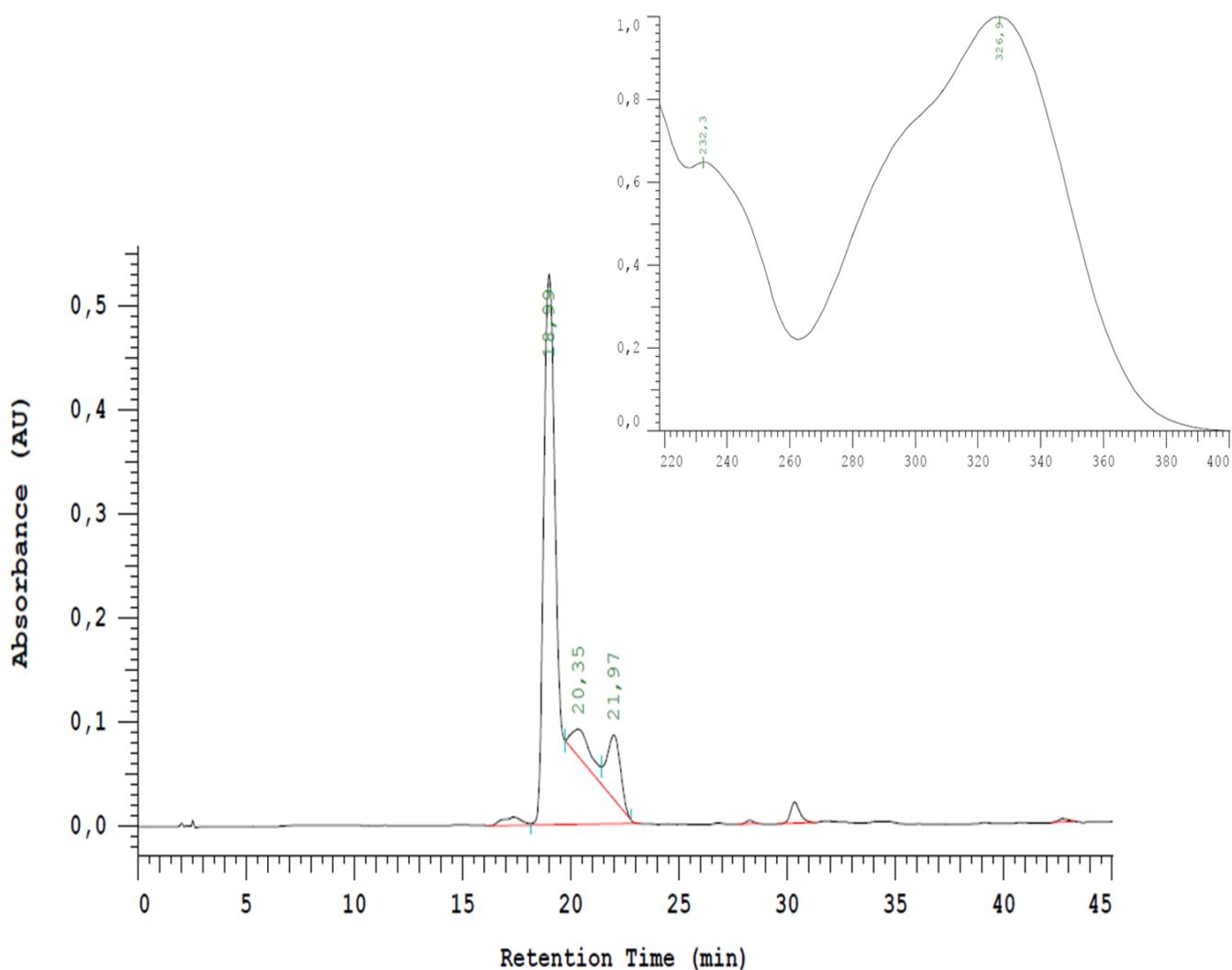


Figura 21: Cromatograma da fração isolada do decocto, com destaque para o pico em 18,99min e seu espectro.

Na figura 22, tem-se a comparação entre o espectro do pico isolado no tempo de retenção de 18,99 min (preto) com o espectro cujo tempo de retenção do pico é de 16,51 min (azul) do decocto, por meio de suas sobreposições no UV.

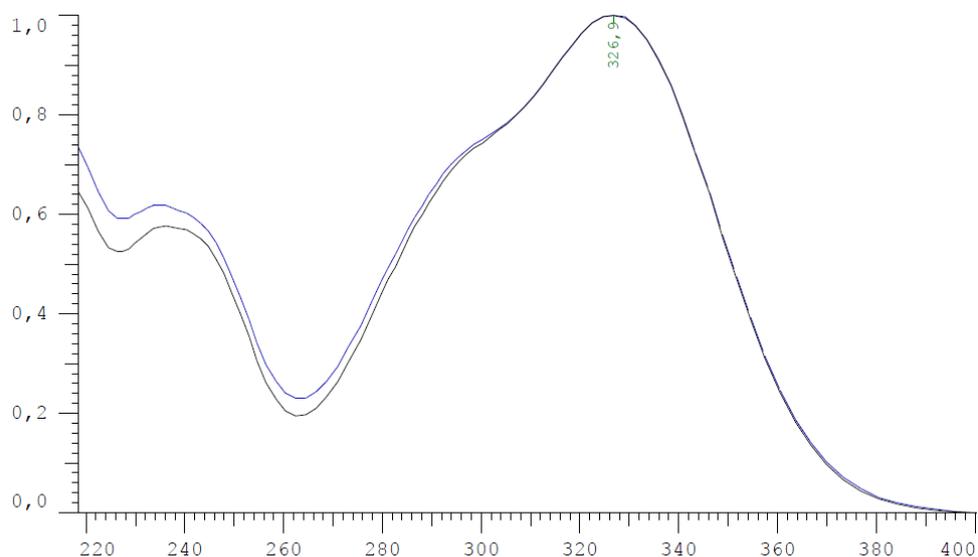


Figura 22: Sobreposição dos espectros da fração isolada com tempo de retenção em 18,99min junto com o espectro do pico com tempo de retenção em 16,51min do cromatograma do decocto.

## **6 DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Inicialmente, com o objetivo de cumprir a legislação vigente, RDC 14 de 31 de Março de 2010, foi realizada a identificação do material vegetal para confirmação do relatório técnico, através do estudo anatômico do limbo foliar e do pecíolo de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli, uma vez que existem vários estudos sobre a qualidade de amostras vegetais que demonstraram não conformidade com a referida norma. Esta informação é corroborada por Brandão (1998) que verificando a qualidade de amostras comerciais de camomila (*Matricaria recutita* L.), constataram falta de padronização e qualidade em 96% das amostras avaliadas. Posteriormente, os testes de qualidade com o boldo (*Peumus boldus* Molina), camomila (*Matricaria recutita* L.), cidreira (*Melissa* sp. e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.), erva doce (*Pimpinella anisum* L.) e hortelã (*Mentha* sp.), mostraram grande discordância com as normas vigentes, confirmando que a indústria não segue rigorosamente os princípios de qualidade requeridos para drogas de origem vegetal (BRANDÃO et al., 2002).

As características anatômicas observadas na amostra comercial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli mostraram-se semelhantes aquelas comuns ao gênero, entretanto outras deixam dúvidas quanto à autenticidade da amostra. Na análise do limbo foliar foram vistos que as células em vista frontal, em ambas as faces, apresentam formato quadrangular e retangular com paredes levemente sinuosas e delgadas indicando características comuns ao gênero (Figura 7A e 7B).

As estruturas do parênquima esponjoso e do tecido paliçádico referidos na figura A, bem como os feixes vasculares que têm xilema voltado para região superior e floema para face oposta (Figura 7C e 7D) já haviam sido mapeadas por Leite e colaboradores (2007). No entanto, o presente trabalho apresenta informações ainda não relatadas na literatura e que caracterizam a espécie em questão no que diz respeito ao limbo foliar. Em vista frontal as células, em ambas as faces apresentam deposição de cera epicuticular de aspecto granular (Figura 7E). Além disso, as células do parênquima esponjoso apresentam-se com paredes delgadas, heterodimensionais e com formatos variados, além de espaços intercelulares bem desenvolvidos (Figura 7B).

A folha é anfiestomática. O complexo estomático é formado por um par de células subsidiárias laterais ligadas às células-guardas, tipicamente paracítico e que

ocorrem no mesmo nível das células do limbo (Figura 7E). Tomlinson (1982) também observou a presença de estômatos em ambas as epidermes, no entanto Leite (2007) viu estas estruturas somente na epiderme adaxial.

O pecíolo, em secção transversal, apresenta formato triangular a hexagonal que se assemelha anatomicamente ao do pecíolo da *Sagittaria lancifolia*, também da família Alismataceae (TOMLINSON, 1982) com uma delgada cutícula, a epiderme é uniestratificada, apresentando células de formato poligonal, com paredes lisas (Figura 8A). Em contrapartida, Matias (2007) observou formato circular do pecíolo em corte transversal.

Observam-se duas a três camadas de células parenquimáticas compactas, nas quais se encontram canais secretores e feixes vasculares menos calibrosos em relação aos feixes vasculares do parênquima aerífero (Figura 8B). Estas estruturas, canais secretores e feixes vasculares no parênquima aerífero, além de terem sido vistas por Leite (2007) na espécie *E. macrophyllus*, foram visualizadas da mesma forma por Andrade (2007) no pecíolo de *Sagittaria montevidenses* também uma Alismataceae.

Ainda no pecíolo, há presença de diafragmas, que são septos de células braciiformes que interrompem os grandes espaços intercelulares existentes, evitando o colapso do órgão caso haja uma lesão na parte submersa da planta (Figura 8D e 8E). Segundo Leite (2007) a presença de diafragmas é característico do gênero *Sagittaria*, mas também foi observada na espécie *E. macrophyllus*. Glória (2003) destacou a presença dessas estruturas na espécie *Echinodorus paniculatus*. Complementando, afirmou também que os diafragmas podem estar presentes interceptando aerênquimas de outras espécies vegetais de hábitat aquático ou de ambientes alagados.

Todas essas características acima citadas são descritas por Matias e Soares (2007) como sendo comuns às espécies de *Echinodorus glandulosus*, *E. palaefolius*, *E. pubescens*, *E. subalatus*, *E. lanceolatus* e *E. paniculatus* encontradas no Nordeste brasileiro.

Foi observada também, a presença de pecíolos com tamanho e formato diferenciados em relação à espécie em estudo. Este achado é de fundamental importância para alertar a necessidade da realização do controle farmacognóstico do material utilizado na produção de fitoterápicos. De acordo com Matias (2007), esta parte do vegetal encontrada não se assemelha a nenhuma estrutura de *Echinodorus*

*macrophyllus*, mas sim com o escapo em secção transversal de *Echinodorus subalatus*.

Essa informação sugere contaminação do material vegetal o que é uma falha muito séria quando se trata de matéria-prima para a produção de fitoterápicos. Mas essa não é a primeira vez que isso acontece. Vários trabalhos como os de Brandão (1998), Melo (2004), Leite (1996), Nascimento (2004), Engel (2008), Ribeiro (2005), Milaneze-Gutierrez (2003), Melo (2007) e Zaroni (2004), relatam o problema com a qualidade dos insumos e conseqüentemente com os próprios fitoterápicos, tendo como referência algumas vezes o estudo morfo-anatômico.

Houve semelhanças nos resultados obtidos na prospecção fitoquímica realizada no decocto do material vegetal com os testes microquímicos realizados nos cortes histológicos das folhas e pecíolos. As reações positivas em comum foram apontadas para os seguintes testes: açúcares redutores, alcalóides, fenóis e esteróides.

Assim como afirma Milaneze-Gutierrez (2003), neste trabalho buscou-se a correta identificação da espécie em estudo como forma de controle de qualidade para a identificação de possíveis adulterações realizando análises em fragmentos de material vegetal seco, rasurado e de pós. Corroborando a idéia daquele autor os aspectos morfo-anatômicos dos órgãos e a identificação dos tecidos vegetais foram determinantes para verificar a autenticidade da amostra.

O problema da adulteração chega a atingir proporções consideráveis como cita Oliveira em um trabalho realizado em 1973, onde na análise de 100 insumos vegetais adquiridos por um laboratório, foram constatadas 21 adulterações, que consistiam na substituição da parte usada do vegetal, na contaminação com outras espécies vegetais ou na total substituição do vegetal (OLIVEIRA, 1973).

No presente trabalho a amostra recebida para análise encontrava-se em sua totalidade rasurada e triturada. Isso comprometeu a identificação morfológica do material. Esse mesmo problema foi encontrado por Nascimento (2005) e Brandão e colaboradores (1998) afirmando em seu trabalho que apesar de a Farmacopéia Brasileira preconizar que a droga deve ser constituída de capítulos florais inteiros, a maior parte das amostras utilizadas em seus trabalhos se encontrava bastante destruída. Além disso, foram detectadas flores estranhas e insetos em todos os grupos de amostras analisadas por eles. O mesmo aconteceu com a amostra deste

trabalho quando foram encontrados pedaços de insetos e elementos vegetais não característicos da espécie em estudo.

Melo (2004) diz que embora se tenha parâmetros específicos para a produção e comércio de fitoterápicos, a fraude e a má qualidade têm preocupado profissionais da área de saúde, e a comunidade científica. A ausência de qualidade, a adulteração e a incorreta utilização, interferem na eficácia e até mesmo na segurança do produto.

Nas análises espectroscópicas da região do infravermelho realizadas com o pó da droga e o extrato seco observa-se que há um aumento da intensidade das bandas observadas no espectro do pó para o do extrato. A banda a  $3290\text{ cm}^{-1}$  está presente nos dois espectros e é correspondente as vibrações de estiramento O–H por associações poliméricas características de alcoóis e fenóis. Como essa banda é mais intensa no extrato, supõe-se que a extração liberou mais grupos hidroxila, dos metabólitos extraídos, para interagir com a radiação infravermelha.

Na termogravimetria do extrato seco sob razão de aquecimento de 5, 10 e  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , as variações da curva DTG indicam duas perdas de massa, sendo que entre 100 e  $350^{\circ}\text{C}$  observa-se uma perda que se divide em duas reações principais e várias outras rápidas correspondendo à saída dos componentes do extrato (Figura 14, 15 e 16). Em todas as análises do extrato observa-se que a DTG não se apresenta bem definida, levando-se em conta que a DTA também sofre muitas oscilações.

Na calorimetria exploratória diferencial da droga, as análises de DSC do pó da droga, a  $15^{\circ}\text{C}$  apresentam um pico nítido em torno de  $115^{\circ}\text{C}$  (Figura 17), o qual é um pico endotérmico que pode corresponder à fusão ou transição de fusão de um componente da amostra, esse fenômeno pode estar relacionado com a retirada da celulose, proveniente da parede celular.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

Apesar de as amostras analisadas terem apresentado características anatômicas comuns ao gênero *Echinodorus*, não se pode afirmar que elas pertençam à espécie *Echinodorus macrophyllus* uma vez que: a droga recebida para ser analisada estava rasurada impossibilitando a caracterização morfológica completa do material, além de se poder observar a presença de elementos e estruturas que não pertencem à espécie *E. macrophyllus*, o que indica contaminação com outras espécies vegetais. De toda maneira, é importante ressaltar que para a produção de medicamentos fitoterápicos à base de *E. macrophyllus*, a parte utilizada é a folha desse vegetal onde estão presentes os marcadores químicos e os possíveis princípios ativos, o que compromete a amostra recebida, uma vez que parte desta era de pecíolos, caules e elementos lenhosos, além de asas e pedaços de insetos. Apesar de terem sido detectados qualitativamente através das análises microquímicas, certamente, a adulteração da amostra dificultou o isolamento e identificação de marcadores químicos, já que a metodologia desenvolvida no decorrer do trabalho voltou-se para a espécie *Echinodorus macrophyllus*. As análises termogravimétricas contribuíram para estabelecer parâmetros e caracterizar a amostra comercial trabalhada.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica, uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <<http://www.abifito.com.br>>. Acesso em: 7 maio 2010.

ARAGÃO, C. F. S.; SOUSA, F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACEDO, R. O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 60-61, 2002.

ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ARAÚJO, A. A. S.; S. MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPITIS, S.; AMTOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, Belém, v. 4, 2001. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/rcientifica>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. Distribuição geográfica e composição química de Chapéu de Couro (*Echinodorus* spp.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, p. 213-218, 2001.

BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; SOARES, C. D. V. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno Saúde Pública**, v. 14, p. 613-616, 1998.

\_\_\_\_\_. ALVES, R. M. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M. T.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 56-59, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. RDC nº48, de 16 de Março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Seção 1, p. 39.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 fev. 2000. Seção 1, p. 25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. RDC nº 14 de 31 de Março de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 abr. 2010. Seção 1, p. 85.

BRASIL, Lei nº 6.360 de 23 de Setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências.

**Diário Oficial da União**, Brasília, 24 set. 1976. Seção 1, p.12647

CORREIA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Plantas medicinais**. 2. ed. Jaboticabal : FUNEP, 1994. p. 162

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v. 3.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **INFARMA**, v.16, p. 9-10, 2004.

ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; SILVA, C. M. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 258-264, 2008.

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. **Caderno de Farmácia**, v.1, n.2, p.73-82, 1985.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed., Florianópolis: UFSC, 2001. p. 199-222.

\_\_\_\_\_. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Santa Catarina: UFSC, 2001. P. 199-222.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M.; **Nomenclatura em análise térmica**. São Paulo: Cerâmica, 1988. Parte II. p 163-164.

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. Minas Gerais: UFV, 2003. p. 120-121.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. The Alismataceae. **Flora Neotropica**, v. 64, p.109, 1994.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Nova York: Mc-Graw-Hill, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Nacional, 1993. 730 p.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 2939-2943, 2000.

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

LEHTONEN, S. Systematics of the Alismataceae – Amorphological evaluation. **Aquatic Botany**, v. 91, p. 279-290, 2009.

\_\_\_\_\_. MYLLYS, L. Cladistic analysis of *Echinodorus* (Alismataceae): simultaneous analysis of molecular and morphological data. **Cladistics**, v. 24, p. 218-239, 2008.

LEITE, S. N.; BIAVATTI, M. W. Avaliação da qualidade de chás medicinais e aromáticos comercializados em Itajaí-SC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 175-184, 1996.

LEITE J. V. P.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; BARROS, A. M. D. Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli (chapéu-de-couro) – Alismataceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 242-248, 2007.

LESSA, M. A.; ARAÚJO, C. V.; KAPLAN, M. A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇÁ, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 161-168, 2008.

LOPES, C. L.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M.; SILVA, L. F. M.; SOUZA, G. P.; ARAÚJO, I. M.; NETO, J. F. M.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology letters**, v. 116, p. 189-198, mar. 2000.

MACHADO, R. D.; COSTA, C. G.; FONTENELLE, G. B. Anatomia foliar de *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasileira** v.1, p. 275-285. 1988.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivate from from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Med**, v. 59, p.465-467, 1993.

MATIAS, L. Q.; SOARES, A.; SCATENA, V. L. Consideração sistemática do pecíolo das espécies de *Echinodorus* Richard (Alismataceae) do Nordeste do Brasil. **Revista Flora**, v. 202, p. 395-402, 2007.

MATSUDA, H.; KOBAYASHI, G.; YAMAHARA, J.; FUJIMURA, H.; KURAHASHI, K.; FUJIWARA, M. Effects of alismol isolated from *Alismatis Rhizoma* on calcium-induced contraction in the rabbit thoracic aorta. **Life Science**. v. 41, p. 1845-1852, 1987.

MEI, N.; GUO, L.; LIU, R.; FUSCOE, J. C.; CHEN, T. Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats. **BMC Bioinformatics**, v. 1, p. 8, nov. 2007. Suplemento n. 4.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, p. 27-36, 2007.

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

MILAZENE-GUTIERRE, M. A.; MELLO, J. C. P.; DELAPORTE, R. H. Efeitos da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 23-33, 2003.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas

medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus spp.*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 56-64, 2005.

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

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. O problema da adulteração de drogas. **Revista Brasileira Farmacognosia.**, v. 54, n. 2, p. 71-83, 1973.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham.&Schltdl.) Micheli (Chapéu-de-couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 623-628, 2006.

PINTO, A. C.; REGO G. C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO C. C.; REIS, A. P.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 435-439, 2007.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; BARROS, A. M. D. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

RIBEIRO, P. A. M; ARANTES, M. C. B.; SANDOVAL JR., J. C. S; AMORIM, L. L. R. S. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 176-179, 2005.

SCHNITZLER, E.; PEREIRA, C. A.; CARVALHO FILHO, M. A. S. Estudo termoanalítico (TG, DTG, DSC) dos cafés *in natura* e processados. **Publicatio - UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 11, n. 1, p. 61-66, 2005.

SCHNITZLER, E.; BENINCA, C.; KOBELNIK, M.; SOTELO, G. F. C.; CARNEIRO, P. I. B. Estudo, caracterização e determinação do grau de pureza de amostras comerciais de sacarina. **Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, 2005.

SHIGEMORI, H.; SHIMAMOTO, S.; SEKIGUCHI, M.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Echinodolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eight-Membered Lactone Ring from the Leaves of *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 82-84, 2002.

SILVA JUNIOR., A. A., VIZZOTTO, V. J., GIORGI, E., et al. **Plantas medicinais, caracterização e cultivo**. Florianópolis : EPAGRI, 1994. 71p.

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S.; Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 445-450, 2010.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região do Alto paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, p. 135-142, 2006.

TANAKA, C. M. A.; SIRRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v. 44, p.1457-1459, 1997.

TIBIRIÇÁ, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.; KAPLAN, M. A.; LESSA, M. A.; FIGEUIREDO, M. R. Pharmacological Mechanisms Involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Pharmacology**, v. 111, p. 50-55, 2007.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons VII. Helobiae (Alismatidae)**. Oxford: Clarendon Press, 1982.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, fev. 2005.

WHO. Guidelines for appropriate use of herbal medicines. World Health Organization Manila. 1998. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2945e/>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

YAMAHARA, J.; KOBAYASHI, G.; IWAMOTO, M.; MATSUDA, H.; FUJIMURA, H. The effect of alismol isolated from *Alismatis* rhizome on experimental hypertensive models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 3, p. 57-60, 1989.

YUNES, R. A; PEDROSA, R. C, CECHINEL FILHO. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, jun. 2000.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W. S. M.; FÁVERO, M. L. D.; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 29-39, 2004.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### ANEXO A- Metodologia utilizada na prospecção fitoquímica

#### 1) TESTE PARA SAPONINA ESPUMÍDICA

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de água destilada. Em seguida, dilui-se para 15mL e agitado vigorosamente durante dois minutos em tubo fechado. Se a camada de espuma permanecer estável por mais de trinta minutos, o resultado é considerado positivo para saponina espumídica.

#### 2) TESTE PARA ÁCIDOS ORGÂNICOS

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de água destilada, filtrado e transferido 2mL para um tubo de ensaio e adicionados 16 gotas do Reativo de Pascová, sendo quinze da solução A e uma da solução B. Se houver descoloração do reativo, a reação é positiva.

#### 3) AÇÚCARES REDUTORES

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de água destilada, filtrado e adicionados 2mL do Reativo de Fehling A e 2mL do Reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho maria em ebulição durante cinco minutos. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores.

#### 4) HETEROSÍDEO CIANOGENÉTICO

Foram colocados em um erlenmeyer 10mg da planta fresca bem triturada, 10mL de água destilada e 1mL de ácido sulfúrico concentrado, vedado o erlenmeyer com uma rolha de cortiça onde estava preso o papel reativo de picrato de sódio sem contato com as paredes do erlenmeyer, nem com a mistura. Aqueceu-se a 50°C durante trinta minutos. Se o papel se corasse de marrom-avermelhado, indicaria reação positiva para substância em questão.

## 5) POLISSACARÍDEOS

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de água destilada, filtrados e adicionadas duas gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indicaria resultado positivo.

## 6) PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

Foram dissolvidos 25mg de extrato seco em 5mL de água destilada. Filtrou-se, adicionou-se 0,5mL de solução aquosa de Nihidrina a 1% e aqueceu-se até a ebulição. O aparecimento de coloração violeta indicaria reação positiva.

## 7) FENÓIS E TANINOS

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de água destilada, filtrado e adicionado duas gotas de solução alcoólica de cloreto férrico a 1%. Qualquer mudança de coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco que é com água. Então, quando a coloração inicial fica entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Quando o precipitado for escuro de tonalidade azul, indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.

## 8) FLAVONÓIDES

Foram dissolvidos 50mg do extrato seco em 10mL de metanol. Filtrado e adicionado cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

## 9) ALCALÓIDES

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de solução de HCl a 5%. Filtrada e separadas quatro porções de 1mL em tubos de ensaio e adicionadas três gotas dos seguintes reativos: Reativo de Bouchardat: origina um precipitado

avermelhado; Reativo de Dragendorff: origina um precipitado vermelho tijolo; Reativo de Mayer: origina um precipitado branco.

#### 10) PURINAS

Numa cápsula de porcelana, foram colocados 5mg do extrato seco, três gotas de solução de HCl 6N e duas gotas de peróxido de hidrogênio a 30%. Foi evaporado em banho Maria até a formação de um resíduo de cor vermelha e em seguida colocadas três gotas de solução de hidróxido de amônio 6N. O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

#### 11) GLICOSÍDEOS CARDÍACOS

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco e 5mL de metanol, filtrado e separado em duas porções de 2mL cada e adicionadas gotas do reativo de Keede. A coloração azul ou violeta indica reação positiva. Pode-se adicionar três gotas de solução de nitroprussiato de sódio a 5% e três gotas de hidróxido de sódio 2N. Se apresentar coloração roxa, indica reação positiva.

#### 10) CATEQUINAS

Foram dissolvidos 15mg do extrato seco em 3mL de metanol, filtrou-se e juntou-se 1mL de solução aquosa de valinilina a 1% e 1mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

#### 11) DERIVADOS BENZOQUINONAS; NAFTOQUINONAS E FENANTRAQUINONAS:

Foram dissolvidos 15mg do extrato seco em 3mL de metanol, filtrou-se, adicionou-se duas de carbonato de cálcio a 25%, duas gotas de formaldeído a 4% e duas de o-dinitrobenzeno a 5% e aqueceu-se a mistura em banho maria. Coloração violeta indica reação positivo.

## 12) SESQUITERPENOLACTONA E OUTRAS LACTONAS

Foram dissolvidos 15mg do extrato seco em 3mL de metanol, filtrou-se e adicionou-se doze gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina a 10% e duas gotas de solução metanólica de hidróxido de potássio a 10%. Aqueceu-se levemente em banho maria durante dois minutos. Em seguida esfriou-se e acidificou-se com solução de HCl a 1N. Foi adicionada uma gota de cloreto férrico a 1%. O aparecimento de coloração violeta indica reação positiva.

## 13) ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES

Foram dissolvidos 50mg do extrato seco em 10mL de clorofórmio. Filtrou-se sobre carvão ativado e transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio. Foi adicionado 1mL de anidrido acético e agitado suavemente, em seguida adicionadas três gotas de ácido sulfúrico concentrado. Agitar novamente. Observar se há rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente que indicam resultado positivo.

## 14) CAROTENÓIDES

Foram dissolvidos 15mg do extrato seco em 3mL de clorofórmio. Filtrou-se e juntou-se 2mL de clorofórmio saturado com tricloreto de antimônio. O aparecimento de coloração azul indica reação positiva.

## 15) ANTRAQUINONAS

Foram dissolvidos 25mg do extrato seco em 5mL de tolueno. Filtrou-se e adicionou-se 2mL de solução de hidróxido de amônio a 10% e agitou-se levemente.

**ANEXO B- Laudo técnico de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Mich. (Chapéu de couro).**

**Controle de qualidade**  
Laudo Técnico e Identificativo

**NOMENCLATURA: CHAPEU DE COURO RASURADO**

Nome científico (gênero/espécie):	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Esterilização:	Houve
Identificação botânica:	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Família:	Alismataceae
Parte utilizada:	Folha	Origem:	Brasil
Manufatura/Vál (mês/ano):	01/2008 - 01/2011	Lote:	CHPCR018108
Método de secagem:	Estufa	Granulometria:	

**Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:**

Trilhos longo-ovóides, oblongo-lanceolados ou cordiformes, acuminadas no ápice, de superfície rugosa, áspera. Com nervuras salientes na parte inferior.

**Teste de pureza e integridade:**

Umidade: 10,6% (\*esp. máx. 17%); Cinzas totais: 9,7% (\*esp. máx. 18%); Cinzas insolúveis: 2,82% (\*esp. máx. 15%).

**Análise de princípios ativos e/ou marcadores:**

\*\* Teste para Havanoides: Positivo

**PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS**

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 10.000 ufc/g	De Acordo
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufc/g ou ml	De Acordo
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufc/g ou ml	De Acordo
<i>E. coli</i>	Ausência	De Acordo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	De Acordo
<i>Pseudomonas</i> sp	Ausência	De Acordo
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	De Acordo