

LUCILIA VILELA DE MELO

**“AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DE MIKANIA LAEVIGATA E
MIKANIA GLOMERATA POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCILIA VILELA DE MELO

**“AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DE *MIKANIA LAEVIGATA* E
MIKANIA GLOMERATA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Lucilia Vilela de Melo


e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biociências e Tecnologia de
Produtos Bioativos, na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

**CAMPINAS,
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M491a Melo, Lucilia Vilela de, 1984-
Avaliação da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas / Lucilia Vilela de Melo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Mikania laevigata*. 2. *Mikania glomerata*. 3. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). 4. Estabilidade. 5. Validação. I. Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the stability of hidroalcoholic extracts of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* by Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Mikania laevigata

Mikania glomerata

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)

Stability

Validation

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya [Orientador]

Patrícia de Oliveira Carvalho

Ildenize Barbosa da Silva Cunha

Data de defesa: 02-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 02 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya
(orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Patrícia De Oliveira Carvalho



Assinatura

Dra. Ildenize Barbosa Da Silva Cunha



Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Assinatura

Dra. Heliara Dalva Lopes Nascimento

Assinatura

ABSTRACT

In Brazil, the species *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*, known popularly as guaco, are widely used in syrup form due to its bronchodilator effect. The marketing of herbal medicines in Brazil is governed by various laws that guarantee the quality of these, but the quality of the raw material can interfere, fundamental safety and efficacy. Therefore, a stability study of the hydro alcoholic extract of the species mentioned was conducted as recommended by the "Guidelines for conducting stability studies of drugs" published by ANVISA in RE 01 of July 29, 2005. Leaves of both species of Mikania were dried in an oven at 40 ° C and by freeze drying, hydro alcoholic extracts prepared by maceration, which underwent accelerated stability study of 6 months, and long term stability study for 12 months. Samples were stored in different temperatures (22 ° C, 30 ° C and 40 ° C) with and without incident light, and every 3 months were analyzed by UHPLC-MS to monitor their chemical profile, quantifying coumarin and chlorogenic acid. At all conditions of the study, we observed a reduction of the content of the chemical marker of this species, coumarin, greater than 5%, so a shelf life of 2 years cannot be assigned to the hydro alcoholic extracts of these species.

RESUMO

No Brasil, as espécies *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, conhecidas popularmente como guaco, são muito utilizadas na forma de xarope devido ao seu efeito broncodilatador. A comercialização de medicamentos fitoterápicos no Brasil é regida por diversas legislações que primam pela qualidade destes, porém a qualidade da matéria-prima pode interferir de forma fundamental na segurança e eficácia do medicamento. Diante disso, este trabalho realizou um estudo de estabilidade do extrato hidroalcoólico das espécies citadas, conforme preconiza o "Guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos" publicado pela ANVISA na RE 01, de 29 de julho de 2005. Folhas das duas espécies de *Mikania* foram secas em estufa a 40 °C e em liofilizador, foram preparados extratos hidroalcoólicos por maceração, que foram submetidos a estudo de estabilidade acelerado por 6 meses, e estudo de estabilidade de longa duração por 12 meses. As amostras ficaram armazenadas em diferentes temperaturas (22°C, 30°C e 40°C), com e sem incidência de luz, e a cada 3 meses foram analisadas por UHPLC-MS, para acompanhar seu perfil químico, quantificar a cumarina e ácido clorogênico. Em todas as condições do estudo, observou-se uma redução do teor do marcador químico desta espécie, a cumarina, maior que 5 %, sendo assim, não é possível atribuir o prazo de validade de 2 anos para extratos hidroalcoólicos desta espécie.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>M. GLOMERATA</i> E <i>M. LAEVIGATA</i>	2
1.2 MEDICAMENTO FITOTERÁPICO	6
1.3 ANÁLISE QUÍMICA	8
1.3.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	9
1.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA	13
2 OBJETIVOS.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 EQUIPAMENTOS	17
3.2 REAGENTES QUÍMICOS.....	17
3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	18
3.4 PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS	19
3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS	19
3.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR UHPLC-MS.....	19
3.6.1 ANÁLISE DO TEOR DE CUMARINA E DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS	20
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA NOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE <i>MIKANIA LAEVIGATA</i> E <i>MIKANIA GLOMERATA</i> POR UHPLC-ESI-MS.	21
3.7.1 SELETIVIDADE	22
3.7.2 EFEITO DE MATRIZ.....	22
3.7.3 LINEARIDADE	22
3.7.4 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	23
3.7.5 PRECISÃO	23
3.7.6 EXATIDÃO.....	24
3.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	24
3.8.1 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS NO ESTUDO DE ESTABILIDADE	25
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE DIFERENTES AMOSTRAS	25
3.9.1 AMOSTRAS COMERCIAIS	25

3.9.2 AMOSTRAS CULTIVADAS.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 COLETA, PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E EXTRATOS.....	28
4.2 ANÁLISE INICIAL DOS EXTRATOS.....	29
4.2.1 TEOR DE SÓLIDOS	29
4.2.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PRELIMINAR DOS EXTRATOS.....	30
4.2.2.1 ANÁLISE DO TEOR DE CUMARINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO	36
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	37
4.3.1 SELETIVIDADE	37
4.3.2 EFEITO DE MATRIZ.....	42
4.3.3 LINEARIDADE	43
4.3.4 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	46
4.3.5 PRECISÃO	46
4.3.6 EXATIDÃO.....	47
4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	48
4.5 AMOSTRAS COMERCIAIS E AMOSTRAS CULTIVADAS EM DIFERENTES REGIÕES	64
5 CONCLUSÃO	67
6 BIBLIOGRAFIA.....	69

“Ter-se a consciência de que se é ignorante, constitui um grande passo na direção da sabedoria.”

Benjamin Disraeli

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir e me dar forças para realizar este trabalho e por sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

À Alexandra pela orientação, pelos ensinamentos, compreensão e principalmente por toda a paciência! Agradeço pela grande disponibilidade, por todas as vezes que ficou seus horários de almoço e final do dia comigo! Muito obrigada por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Marcos J. Salvador, coordenador do Programa de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, por toda a compreensão e auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Química, Carol H. Collins, Isabel C. S. F. Jardim, Carla B. G. Bottoli e Fabio Augusto, por sempre me incentivarem a continuar estudando e por concordarem com todas as vezes que precisei alternar meus horários de trabalho para cumprir as disciplinas. Obrigada por todo o apoio e confiança.

À Glyn do CPQBA-Unicamp por fornecer amostras que foram utilizadas neste trabalho.

Aos amigos e colegas do Instituto de Biologia, em especial à Begoña, Eduardo, Natália, Carol, Carlos e Aislan. Muito obrigada por toda ajuda, conversas, risadas e desabafos!

Ao Adilson pela indispensável ajuda no tratamento estatístico dos dados desse mestrado. MUITÍSSIMO obrigada!

À Heliara e à Flamys por tirarem todas as minhas dúvidas sobre Validação!

Ao Rafael da Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos por toda ajuda, disponibilidade e paciência.

Á minha querida professora e amiga Dena por me apresentar à Alexandra e por estar presente em muitos momentos deste trabalho.

Aos alunos dos laboratórios do Bloco A2 do Instituto de Química por compreenderem minha ausência em alguns momentos dos laboratórios e por sempre me apoiarem nessa jornada.

À minha família: meus pais, João e Maria Helena, meus irmãos, Leandro e Liliam, meus cunhados, Vivi e Marcelo e meus amados sobrinhos, Vinícius e Murilo, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, pelo amor e carinho. Obrigada por fazerem de mim o que sou. Amo vocês!

Ao meu namorado Leandro, por sempre me apoiar, me dar forças, carinho e amor. Obrigada por estar ao meu lado na realização de mais esta conquista.

Ao Pimpim, Rose e à diretoria do Instituto de Química por autorizar as alterações em meu horário de trabalho para que eu pudesse cursar as disciplinas.

Às agências de fomento que possibilitam a realização deste projeto de pesquisa.

Ao Instituto de Biologia e à Unicamp pela oportunidade em realizar este projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

UV – ultra violeta

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

m/z - razão massa/carga

ESI - Eletrospray

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

GC – Cromatografia Gasosa

CG-FID - Cromatografia Gasosa acoplada a detector por ionização em chama

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DAD - Arranjo de Diiodo

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

tR – Tempo de Retenção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos químicos de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	4
Tabela 2: Parâmetros definidos para o desenvolvimento do estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos.....	7
Tabela 3: Gradiente utilizado para avaliação cromatográfica.	20
Tabela 4: Informações físico-químicas dos compostos cumarina e ácido clorogênico.	21
Tabela 5: Estudo de estabilidade dos extratos de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	25
Tabela 6: Amostras comerciais de drogas vegetais e extratos de guaco.	26
Tabela 7: Amostras de guaco cultivadas em diferentes localidades.....	27
Tabela 8: Rendimento do processo de secagem das folhas e de resíduos sólidos dos extratos preparados para o estudo de estabilidade.....	29
Tabela 9: Valor médio (n = 3) do teor de cumarina e ácido clorogênico encontrados nos extratos de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	37
Tabela 10: Valores obtidos para avaliação do efeito de matriz.	43
Tabela 11: Valores de área para cumarina e ácido clorogênico para precisão da amostra de <i>M. glomerata</i>	46
Tabela 12: Valores de área para cumarina e ácido clorogênico para precisão da amostra de <i>M. laevigata</i>	47
Tabela 13: Recuperação para as amostras de <i>Mikania</i>	48
Tabela 14: Condições do estudo de estabilidade desenvolvido.	49
Tabela 15: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo de estabilidade de longa duração.....	50
Tabela 16: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo de estabilidade acelerado.	50
Tabela 17: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo a temperatura ambiente com incidência de luz.	50
Tabela 18: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo a temperatura ambiente sem incidência de luz.	50

Tabela 19: Teor de ácido clorogênico nas amostras durante o estudo de estabilidade de longa duração.	51
Tabela 20: Teor de ácido clorogênico nas amostras durante o estudo de estabilidade acelerado.	51
Tabela 21: Teor de ácido clorogênico nas amostras o estudo a temperatura ambiente com incidência de luz.	51
Tabela 22: Teor de ácido clorogênico nas amostras o estudo a temperatura ambiente sem incidência de luz.	51
Tabela 23: Teor de cumarina durante o estudo de estabilidade acelerado para as amostras comerciais.	52
Tabela 24: Teor de ácido clorogênico durante o estudo de estabilidade acelerado para as amostras comerciais.	52
Tabela 25: Porcentagem de redução do teor de cumarina para os extratos avaliados.	62
Tabela 26: Porcentagem de redução do teor de ácido clorogênico para os extratos avaliados.	63
Tabela 27: Teor de cumarina e de ácido clorogênico em amostras comerciais de diferentes localidades.	64
Tabela 28: Teor de cumarina e de ácido clorogênico em amostras cultivadas em diferentes localidades.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de alguns compostos identificados na <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	3
Figura 2: Desenho simplificado de uma fonte de ionização por <i>eletrospray</i>	11
Figura 3: Esquema simplificado de um analisador de massas quadrupolar.	13
Figura 4: Esquema do processo de secagem das folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> .18	
Figura 5: Folha da amostra de <i>M. glomerata</i> obtida em Ubatuba - SP.....	23
Figura 6: Foto das espécies cultivadas no campo experimental do IB- Unicamp: <i>Mikania glomerata</i> (A); <i>Mikania laevigata</i> (B).	28
Figura 7: Detalhe para o formato das folhas de <i>M. glomerata</i> (A) e <i>M. laevigata</i> (B).	29
Figura 8: Cromatogramas obtidos com detecção por ESI-MS em modo positivo dos extratos das folhas de <i>Mikania laevigata</i> secas em liofilizador (A), <i>Mikania laevigata</i> secas em estufa (B), <i>Mikania glomerata</i> secas em liofilizador (C) e <i>Mikania glomerata</i> secas em estufa (D).	30
Figura 9: Cromatogramas obtidos com detecção por ESI-MS em modo negativo dos extratos das folhas de <i>Mikania laevigata</i> secas em liofilizador (A), <i>Mikania laevigata</i> secas em estufa (B), <i>Mikania glomerata</i> secas em liofilizador (C) e <i>Mikania glomerata</i> secas em estufa (D).	31
Figura 10: Cromatograma com detecção por ESI-MS dos padrões de ácido clorogênico (A) em modo negativo (<i>m/z</i> 353) e cumarina (B) em modo positivo (<i>m/z</i> 147).	32
Figura 11: Cromatograma com detecção por ESI-MS do padrão de cumarina (A), dos extratos das folhas de <i>M. laevigata</i> secas em liofilizador (B), <i>M. laevigata</i> secas em estufa (C), <i>M. glomerata</i> secas em liofilizador (D) e <i>M. glomerata</i> secas em estufa (E). Modo positivo (<i>m/z</i> 147).	32
Figura 12: Cromatograma com detecção por ESI-MS do padrão de ácido clorogênico (A), extrato das folhas de <i>M. laevigata</i> secas em liofilizador (B), <i>M. laevigata</i> secas em estufa (C), <i>M. glomerata</i> secas em liofilizador (D) e <i>M. glomerata</i> secas em estufa (E). Modo negativo (<i>m/z</i> 353).	33
Figura 13: Íon observado no pico de tR de aproximadamente 1,90 minutos com <i>m/z</i> 353 observado na <i>M. glomerata</i> (A) e íon observado no pico de tR de aproximadamente 5,18 minutos com <i>m/z</i> 147 observado na <i>M. laevigata</i> (B). Espectro de massas do padrão de ácido clorogênico (C) e do padrão de cumarina (D).	33

Figura 14: Espectros de massas (MS/MS) do padrão de cumarina (A), extrato das folhas de: <i>M. glomerata</i> secas em liofilizador (B), <i>M. laevigata</i> secas em liofilizador (C). Modo positivo (m/z 147).	34
Figura 15: Espectros de massas (MS/MS) do padrão de ácido clorogênico (A), extrato das folhas de <i>M. glomerata</i> secas em estufa (B) e em liofilizador (C). Modo negativo (m/z 353).	34
Figura 16: Fórmula estrutural do ácido clorogênico.	36
Figura 17: Comparação do tempo de retenção do padrão de cumarina preparado em solvente (A) com os extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C). Modo positivo (m/z 147).	38
Figura 18: Comparação do tR do padrão de cumarina (A) após adição nos extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C). Modo positivo (m/z 147).....	39
Figura 19: Comparação dos cromatogramas do padrão de cumarina com os extratos de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> . MS do padrão de cumarina (A), MS dos extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C), MS/MS do padrão de cumarina (D), MS/MS dos extratos de <i>M. glomerata</i> (E) e <i>M. laevigata</i> (F), MS/MS do extrato de <i>M. glomerata</i> após adição do padrão de cumarina (G), MS/MS do extrato de <i>M. laevigata</i> após adição do padrão de cumarina (H). Modo positivo (m/z 147)	40
Figura 20: Comparação do tempo de retenção do padrão de ácido clorogênico (A) com os extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C). Modo negativo (m/z 353).....	41
Figura 21: Comparação do tR do padrão de ácido clorogênico (m/z 353) (A) e dos extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C) após adição do padrão. Modo negativo (m/z 353).	41
Figura 22: Comparação dos cromatogramas do padrão de ácido clorogênico com os extratos de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> . MS do padrão de ácido clorogênico (A), MS dos extratos de <i>M. glomerata</i> (B) e <i>M. laevigata</i> (C), MS/MS do padrão de ácido clorogênico (D), MS/MS dos extratos de <i>M. glomerata</i> (E) e <i>M. laevigata</i> (F), MS/MS dos extratos de <i>M. glomerata</i> (G) e <i>M. laevigata</i> (H) após adição do padrão de ácido clorogênico. Modo negativo (m/z 353).	42
Figura 23: Cromatograma da amostra de <i>M. glomerata</i> obtida na cidade de Ubatuba - SP. Padrão de cumarina (A) em modo positivo (m/z 147), padrão de ácido clorogênico (B) em modo negativo (m/z 353), amostra de <i>M. glomerata</i> (C) modo positivo (m/z 147) e em modo negativo (D) (m/z 353).	44
Figura 24: Curva analítica obtida pela análise de soluções de 1,46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 730 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de cumarina.	45

Figura 25: Curva analítica obtida pela análise de soluções de 10,80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 540 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de ácido clorogênico.....	45
Figura 26: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de <i>Mikania glomerata</i> . Variação do teor de ácido clorogênico em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.	53
Figura 27: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de <i>Mikania glomerata</i> . Variação do teor de ácido clorogênico em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.	54
Figura 28: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de <i>Mikania laevigata</i> . Variação do teor de cumarina em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.	55
Figura 29: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de <i>Mikania laevigata</i> . Variação do teor de cumarina em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.	56
Figura 30: Avaliação da estabilidade de extratos comerciais de guaco (Extrato Fluido e Tintura de guaco) submetidos ao estudo de estabilidade acelerado (40 °C).....	57

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais faz parte da história da humanidade, sendo muito importante para várias culturas. A referência mais antiga que se tem conhecimento do uso da fitoterapia data de mais de sessenta mil anos, sendo as primeiras descobertas realizadas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã. Na China, em 3.000 a.C., já existiam farmacopeias que descreviam as ervas e as suas indicações terapêuticas. A utilização das plantas medicinais faz parte da história da humanidade, sendo de grande importância tanto pelo aspecto medicinal, como por aspectos culturais [1].

Na atualidade, o mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Nos países em desenvolvimento o uso de plantas medicinais tem grande importância, inclusive nos casos onde o acesso ao serviço de saúde moderno é limitado e a fitoterapia representa a única forma de tratamento [2, 3].

Entre 65 e 80% da população dos países subdesenvolvidos dependem exclusivamente das plantas medicinais para os cuidados básicos de saúde, sendo utilizada por 80% da população na África, 71% no Chile e 40% na Colômbia [4].

Ao mesmo tempo, a fitoterapia vem, a cada ano, conquistando mais adeptos nos países desenvolvidos [2, 3]. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em muitos países desenvolvidos existe uma grande porção da população fazendo uso das plantas medicinais. Apesar do acesso à medicina moderna ser possível nesses países, o uso de plantas medicinais tem mantido sua popularidade, por razões históricas e culturais [4].

No Brasil, duas espécies do gênero *Mikania*, popularmente conhecidas como “guaco”, são facilmente encontradas e muito utilizadas na medicina popular na forma de xaropes para tratamento de afecções das vias aéreas, devido ao seu efeito broncodilatador [5]. Dentre as principais espécies medicinais pertencentes a este gênero, encontram-se a *Mikania glomerata* Spreng. e a *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker [6]. Ambas ocorrem principalmente na Floresta Atlântica do Brasil, crescendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo, também, serem encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina [7].

A *Mikania glomerata* está oficializada desde 1929 na Farmacopeia Brasileira 1.^a edição [8, 9], enquanto que a *Mikania laevigata* teve sua monografia incluída somente no sexto fascículo da Farmacopeia Brasileira 4.^a edição [10, 11].

As espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* apresentam semelhanças morfoanatômicas, sendo frequentemente comercializadas indistintamente. Mas, de acordo com trabalhos descritos na literatura, espécies pertencentes a um mesmo gênero podem apresentar diferenças na constituição química [11].

1.1 Composição química de *M. glomerata* e *M. laevigata*

Estudos fitoquímicos das espécies, *M. glomerata* e *M. laevigata*, têm sido amplamente realizados e resultado no isolamento de diversos compostos, sendo alguns deles: cumarina e ácido *o*-cumárico (marcadores químicos desta espécie), álcool, ácidos e ésteres diterpênicos, glicosídeos antociânicos, triterpenos, ácidos, aldeídos e ésteres orgânicos, saponinas, taninos, esteroides, minerais, entre outros [6].

Na *M. glomerata*, estudos fitoquímicos mostram a existência de (além dos marcadores cumáricos) estigmasterol, friedelina, lupeol, *o*-hidroxicinâmico, β sitosterol e os ácidos caurenóico, cinamoilgrandiflórico, ácido *ent*-caur-16(17)-em-19-óico, *ent*-15- β -isobutiloxicaur-16(17)-em-19-óico, *ent*-15- β benzoioxicaur-16(17)-em-19-óico, *ent*-15- β -hidroxicaur-16(17)-em-19-óico, *ent* 17-hidroxicaur-15(16)-em-19-óico, entre outros [6, 12, 13].

Já na *M. laevigata*, estudos recentes realizados por Ferreira *et. al.* em 2010, identificaram 21 compostos utilizando as técnicas de Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (MS). Além da cumarina, foram identificados: ácido orto-[(5-hidroxi)-ciscinamoil]-trans-cinâmico, ácido 19-norcaur-16-ene-18-oic 2- β -[[3-O-(3-hidroxi-1-oxo-3-fenipropil)-2-(3-metil-1-oxobutil-4-O-(α -ramnopiranosil)- β -glucopiranosil]oxi)-13,15- α -hidroxi, caurano-3- β ,16- β ,17-triol 3-O- β -glucopiranosil, taraxerol, lupeol, ácido beierenoico, ácido caurenóico, óxido cariofileno, espatulenol, dihidrocumarina, acetato de lupeol, siringaldeído, trans-melilotosídeo, cis-melilotosídeo, 3,5-di-O-cafeoil quinato de metila, 3,3,5-trihidroxi-4,6,7-trimetoxiflavona, 3-O- β -glucopiranosídeo de patuletina, 3-O- β -glucopiranosídeo de quercetina, 3-O- β -glucopiranosídeo de canferol, e adenosina [14].

A Tabela 1 resume os compostos encontrados nestas duas espécies e a Figura 1 traz a estrutura química de alguns desses compostos.

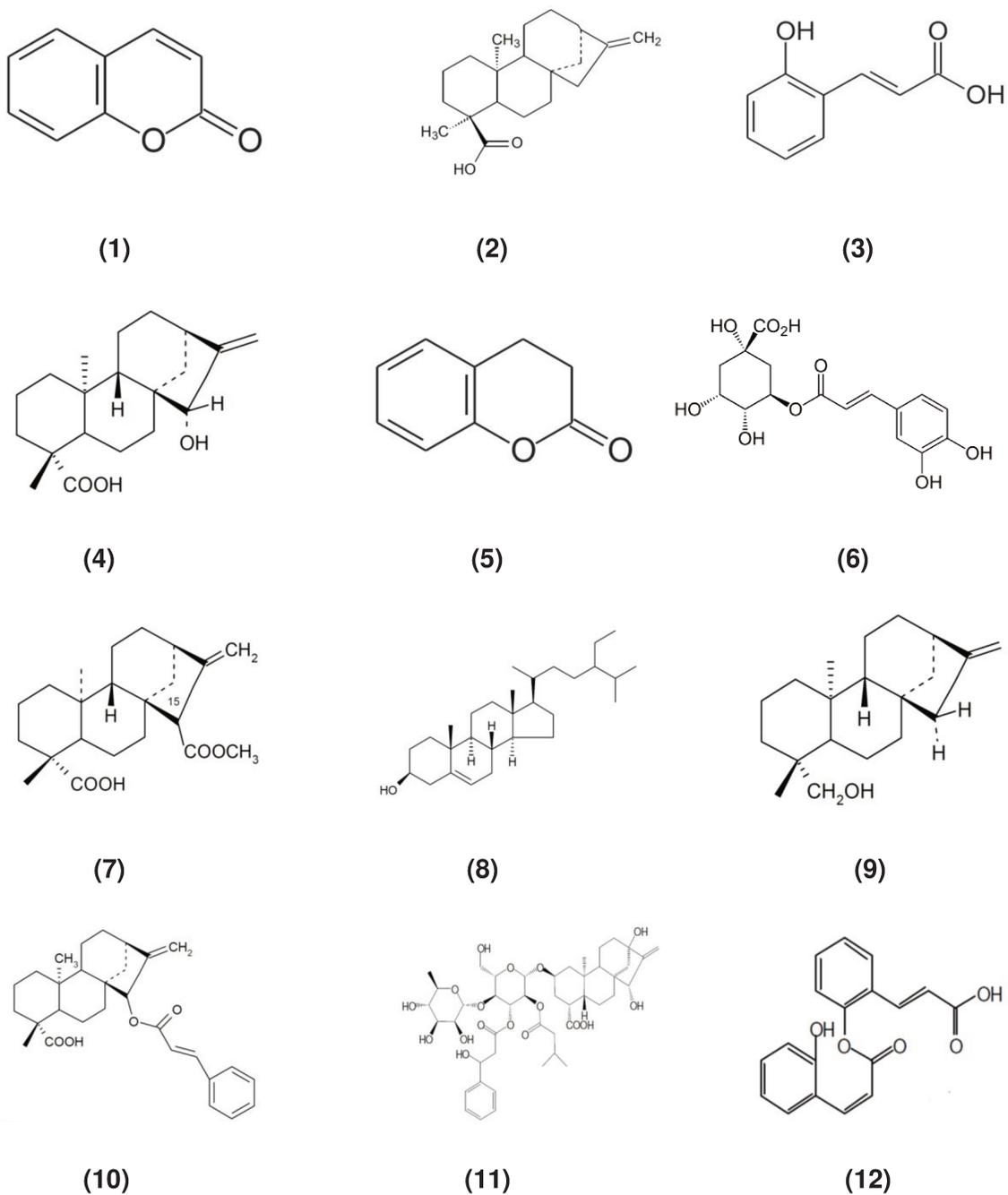


Figura 1: Estrutura de alguns compostos identificados na *M. glomerata* e *M. laevigata*.
Obs. Ver nomenclatura na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos químicos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

<i>Mikania glomerata</i> Spreng.		<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip ex Baker	
Composição química	Referências	Composição química	Referências
(1) Cumarina; (5) dihidrocumarina; (3) ácido <i>o</i> -cumárico	[13, 15] [16, 17] [12, 18, 19] [5]	(1) Cumarina; (5) dihidrocumarina; (3) ácido <i>o</i> -cumárico; <i>ent</i> -3 α - <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicopiranosídeo, 16 α , 17-diidroxicaurano	[12, 14, 18, 20-23]
Espatuleno; <i>ep</i> biciclosesquifelandrêno; <i>trans</i> cariofileno; germacrenos	[12, 24]	Espatuleno; óxido de cariofileno	[12]
Glicosídeos antociânicos	[25]	-	-
Ácidos (2) caurenóico; (10) cinamoilgrandiflórico; (4) grandiflórico (ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico); isômeros de metil ester de ácido caurenóico; <i>ent</i> -beyer-15(16)- <i>ent</i> -19-oico; <i>ent</i> -15 β -benzoiloxicaur- 16(17)-en-19-oico; 17-hidroxi- <i>ent</i> -caur-15(16)-en 19-oico; (7) 15 α -isobutiriloxicaur-16-en-19-oico; isopropiloxi-grandiflórico; diterpênico; ester diterpênico; (9) caurenol	[12, 13, 16, 17, 24, 26]	Ácidos (2) caurenóico; (10) cinamoilgrandiflórico; cupressênico; isopropiloxi-grandiflórico; isobutiloxi-grandiflórico; caurenol; 3-cafeoilquinico; (6) 5-cafeoilquinico; (12) <i>orto</i> -[(5'-hidroxi)- <i>cis</i> -cinamoila]- <i>trans</i> -cinâmico; (11) 2 β -[[3- <i>O</i> -(3-hidroxi-1-oxo-3-fenilpropil)-2-(3-metil-1-butiriloxi) -4- <i>O</i> -(α -L-ramnopiranosil)- β - <i>D</i> glicopiranosil] oxil]-13, 15 α -diidroxil-19- <i>nor</i> caur-16-en-18-óico	[12, 14]
Friedelina; lupeol; acetato de lupeol	[6, 13, 24, 26]	Esteróides e triterpenóides	[6]
-	-	Amino grupos	[6]
Ácidos <i>trans</i> -ohidroxicinâmico; hexadecanóico; 8,11-octadecadienóico; octadecanóico; 9,12,15-octadecatrienóico; ácido 9,12-octadecadienóico; 10,13-octadecadienóico; 2-acetil- <i>trans</i> cinâmico; 1-etoxi-1-feniletanol; 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído; siringaldeído, etil-hexadecanoato; fitol;etil linoleato	[12, 13, 16, 17, 26]	Ácidos hexadecanóico; 9,12,15-octadecatrienóico; 9,12- octadecadienóico; 1-octadeceno; 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona, 2,6-bis; siringaldeído	[12, 27]
Saponinas	[6]	Saponinas	[6]
Taninos	[6]	Taninos	[6]
Campesterol; estigmasterol; (8) β -sitosterol	[13, 26]	Estigmasterol	[6]
Cobre; ferro; zinco	[6]		
<i>d</i> -limoneno; α -elemeno; α -copaeno; β -elemeno; δ -elemeno; <i>trans</i> -cariofileno; α -	[28, 29]	Sabineno; α -pineno; β -pineno; mirceno; p-cimeno; silvestreno; e- β -ocimeno; terpin-4-ol;	[29]

<p>humuleno; germacreno-D; biciclogermacreno; δ-cadineno; elemol; germacreno-B; espatulenol; óxido de cariofileno; <i>epi</i>-α-muurolol; α-cadinol; α-pineno; β-pineno; mirceno; <i>trans</i>-α-cimeno; linalol; terpin-4-ol; α-terpineol; α-cubebeno; β-bourboneno; β-cubebeno; β-cariofileno; cumarina; aromadendreno; β-farneseno; germacreno-A; γ-cadineno; nerolidol-<i>E</i>; globulol; veridiflorol; vidrol; α-acoreno; τ-cadinol; sabineno; silvestreno; terpin-4-ol; nonanal; e-nerolidol; globulol; <i>epi</i>-α-bisabolol; diterpenos</p>		<p>nonanal; 1,4-dimetoxibenzeno; cumarina; α-elemeno; α-copaeno; β-elemeno; β-cariofileno; γ-elemeno; aromadendreno; α-humuleno; germacreno-D; biciclogermacreno; elemol; germacreno-B; e-nerolidol; espatulenol; globulol; óxido de cariofileno; <i>epi</i>-α-muurolol; α-cadinol; diterpenos</p>	
--	--	--	--

O conhecimento dos componentes químicos das espécies citadas é de extrema importância, pois ocorre um sinergismo na ação terapêutica proporcionado pela mistura dos compostos [17, 18, 27, 30, 31].

1.2 Medicamento fitoterápico

Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essas espécies, o xarope e a solução oral de *M. glomerata* foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria Nº. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 [32]. Na Instrução Normativa 5 de 11 de dezembro de 2008, publicada pela ANVISA, 36 plantas medicinais tiveram seu registro simplificado, inclusive a *M. glomerata*, facilitando assim a sua produção industrial [33]. Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública e pela população em geral [33, 34].

Um grande obstáculo para a comercialização de fitoterápicos tanto dentro do Brasil ou com vistas a exportação é a dificuldade em comprovar a eficácia, segurança e qualidade destes medicamentos. [2].

A fim de proporcionar segurança ao usuário do medicamento fitoterápico, a ANVISA publicou em 31 de março de 2010, a Resolução RDC nº14 que dispõe sobre os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos [35] e prevê uma série de documentos necessários para o registro. Dentre estes está o Relatório de Produção e Controle de Qualidade, que exige resultados do estudo de estabilidade acelerada de três lotes-piloto, acompanhados dos estudos de estabilidade de longa duração em andamento, ou estudos de estabilidade de longa duração já concluídos. Todos devem ser executados de acordo com o "Guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos" publicado pela ANVISA na RE 01, de 29 de julho de 2005 [36], bem como referências farmacopeicas consultadas, reconhecidas pela ANVISA e legislação vigente.

Os testes de estabilidade visam definir o prazo de validade, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas do medicamento. Em geral, o prazo de validade de um produto é determinado por um estudo de estabilidade de

longa duração de 12 meses, mas para fins de registro, um estudo de estabilidade acelerado de 6 meses é aceito. Dependendo da forma farmacêutica de apresentação do produto e do tipo de embalagem primária, os parâmetros do estudo podem variar (Tabela 2) [36]. Esta avaliação ainda não é exigida por lei para os insumos, sejam ativos ou não. Porém, os extratos de guaco (tinturas e extratos líquidos de *M. glomerata* e *M. laevigata*) são comercializados com prazos de validade sem nenhum embasamento analítico.

Tabela 2: Parâmetros definidos para o desenvolvimento do estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos.

Forma Farmacêutica	Condição de Armazenamento	Embalagem	Temperatura e Umidade Acelerado	Temperatura e Umidade Longa Duração
Sólido	15°C – 30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR
Sólido	15°C – 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Semi-sólido	15°C – 30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR
Semi-sólido	15°C – 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Líquidos	15°C – 30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C 75% UR ± 5% UR
Líquidos	15°C – 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Gases	15°C – 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Todas as Formas Farmacêuticas	2°C – 8°C	Impermeável	25°C ± 2°C	5°C ± 3°C
Todas as Formas Farmacêuticas	2°C – 8°C	Semi-permeável	25°C ± 2°C 60% UR ± 5% UR	5°C ± 3°C
Todas as Formas Farmacêuticas	-20°C	Todas	-20°C ± 5°C	-20°C ± 5°C

Fonte: Guia para a realização de Estudos de Estabilidade Resolução - RE nº. 1, de 29 de julho de 2005. [36]

A RE nº. 1 de 29 de julho de 2005, ainda determina que seja apresentado laudo de análise da droga vegetal com o perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica e análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico, quando a droga vegetal ou derivado de droga vegetal, for empregada como ativo no medicamento fitoterápico [36].

Não há trabalhos na literatura que relatem estudos conforme descreve a RE nº. 1, de 29 de julho de 2005. Há apenas um estudo do teor de cumarina em xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas, e analisado por espectrometria no Ultra Violeta (UV) com comprimento de onda de 275,4 nm [37].

1.3 Análise química

Muitos trabalhos na literatura utilizam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*" - *HPLC*) para avaliar o perfil químico das duas espécies citadas [11, 18, 38-40].

Celeghini e colaboradores (2001) [38] realizaram análises de doseamento da cumarina em extrato hidroalcoólico das folhas de *M. glomerata*, por HPLC acoplado com detecção por ultravioleta (UV) e verificaram que esta técnica é útil para o controle de qualidade de extratos hidroalcoólicos dessa espécie, uma vez que este método mostrou reprodutibilidade e sensibilidade adequada para os extratos.

Atualmente, o acoplamento de novas técnicas de detecção à HPLC pode auxiliar na análise de produtos naturais. O uso de detectores de UV apresenta a vantagem de se obter o espectro de UV de cada substância, o que fornece uma informação estrutural, e o baixo custo deste detector em relação a outras técnicas alavanca seu uso [2]. Entretanto, a necessidade de uma maior informação estrutural de cada componente das matrizes analisadas levou ao desenvolvimento de técnicas mais modernas, como o acoplamento da HPLC com a Espectrometria de Massas (do inglês "*Mass Spectrometry*" - *MS*). Isto possibilitou a análise de moléculas termolábeis, complexos organometálicos, moléculas de elevada massa molecular, incluindo polímeros e proteínas. Nos produtos naturais, encontram-se matrizes complexas e a separação cromatográfica dos seus componentes nem sempre é completa, fazendo da *MS* uma ferramenta que possibilita a identificação e quantificação dos analitos de interesse sem que sejam isolados [41].

1.3.1 Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molecular de compostos eletricamente carregados através da ionização ou formação prévia de íons pela dissociação molecular induzida por colisão [42].

Os espectrômetros de massas possuem alta sensibilidade e capacidade de identificar íons através da razão massa/carga (m/z), sendo considerados de extrema relevância para a indústria farmacêutica, pois apresentam grande êxito no suporte analítico e elucidação estrutural de novas moléculas [43, 44].

O espectrômetro de massas é composto por três principais componentes: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector. A diferença entre esses componentes distingue os tipos de técnicas as quais independentemente da escolha, exige primeiramente que a amostra seja ionizada em uma fonte de ionização [45].

Diversas fontes de ionização são descritas na literatura, porém as mais comuns e utilizadas são a Ionização através de Eletrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) [46].

A ionização por eletrospray é uma das fontes mais usadas atualmente para a ionização à pressão atmosférica. Quando a amostra é ionizada a pressão atmosférica, a eficiência desta ionização é 10^3 a 10^4 vezes maior que em pressão reduzida [47].

A técnica de ionização por ESI foi desenvolvida em 1984 por Yamashita & Fenn e na década de 90, passou a ser muito utilizada na análise de fármacos, metabólitos e produtos de degradação [47]. Tanto a ESI e a APCI ocorrem à pressão atmosférica e utilizam alta voltagem para fornecer ionização necessária à formação de íons, os quais podem ser detectados e quantificados nos espectrômetros de massas [46]. Na ESI, o processo de ionização ocorre através de um capilar ao qual recebe uma diferença de potencial em relação a um contra-eletródo de voltagens entre 500 e 4500 V, enquanto que em APCI, a ionização se dá através uma agulha a qual produz uma descarga elétrica (corona) diretamente sobre a amostra [45].

A ESI transfere para a fase gasosa moléculas polares de pequenas até grandes massas, que frequentemente são termicamente instáveis, permitindo a análise por espectrometria de massas de biomoléculas como proteínas. Isto era impossível utilizando

fontes de ionização clássicas como ionização por elétrons (EI) onde somente compostos previamente volatilizados poderiam ser ionizados. Como EI é um processo de ionização mais enérgico, geralmente as moléculas se fragmentam e às vezes o íon molecular não é mais observado no espectro, impossibilitando a identificação de compostos em misturas [47].

ESI é considerado o mais robusto dos processos de ionização. Este tipo de fonte fornece um processo de ionização brando, ao qual mantém intacta a molécula precursora com uma ou múltiplas cargas carregadas positivamente ou negativamente de acordo com o sistema dado ao capilar de ionização da amostra. Além disso, este sistema trabalha muito bem com mistura de solventes aquosos e orgânicos sendo, portanto, apropriado para a hifenação com o cromatógrafo líquido. Por ESI ser um método brando de ionização, geralmente as moléculas de até 600 Daltons são observadas principalmente na sua forma monocarregada, sem fragmentação, permitindo a visualização de íons individuais mesmo em misturas complexas. Íons multi-carregados podem ser observados em casos de moléculas maiores. Outra grande vantagem desta técnica está na despreocupação com o tamanho das moléculas a serem ionizadas, o que possibilita o estudo de proteínas e de complexos multimoleculares. Adicionalmente, ESI é uma técnica rápida, sensível, capaz de investigar matrizes complexas com alta sensibilidade e ainda, sem a preocupação com os analitos termicamente sensíveis, o que justifica seu amplo uso [47].

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes mais frequentemente usados em HPLC por fase reversa (metanol, água e acetonitrila), a ESI pode ser usada como interface entre separações por HPLC e identificação dos compostos por espectrometria de massas simples (MS) ou sequencial (MS/MS). Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um modificador à solução. Para analisar moléculas [M] com sítios básicos é adicionado 0,1 a 0,2 % de ácido fórmico à solução, facilitando a protonação do analito, formando íons $[M + H]^+$ e sua análise é feita em modo positivo. Para moléculas contendo sítios ácidos adiciona-se 0,1 a 0,5 % de solução de hidróxido de amônio, o que facilita a perda de um próton da molécula, formando $[M - H]^-$ e análise é feita em modo negativo [47].

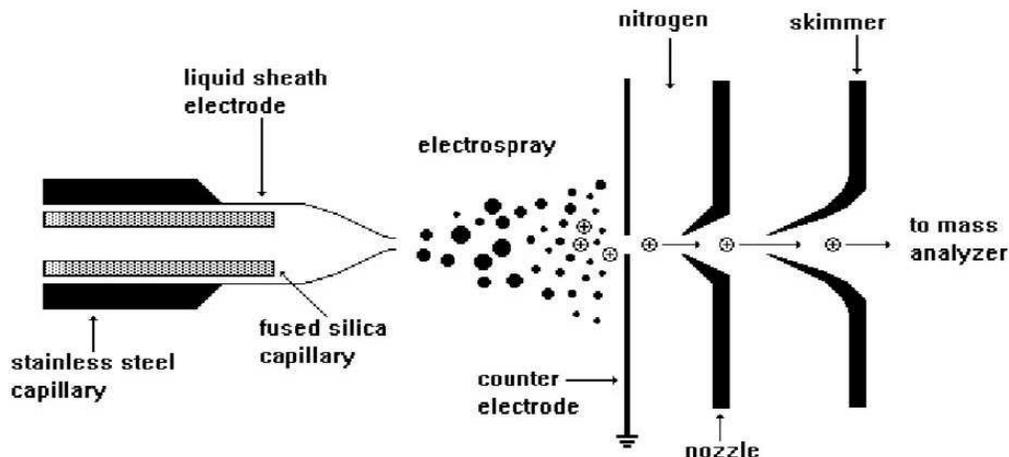


Figura 2: Desenho simplificado de uma fonte de ionização por *eletrospray*.

A Figura 2 apresenta um desenho simplificado de uma fonte de ESI. A solução, proveniente de uma bomba seringa ou de um sistema de HPLC é inserida no capilar em cuja ponta é aplicado um alto potencial positivo para promover protonação (ionização em modo positivo) ou negativo para desprotonação (ionização em modo negativo). O nitrogênio, normalmente usado como gás de nebulização, é aquecido para facilitar a volatilização. Dois mecanismos são propostos para a transferência dos íons das gotículas de solução para a fase gasosa: a “evaporação” dos íons a partir da superfície das gotículas e a subdivisão progressiva das gotículas com evaporação do solvente; e na prática é provável que ocorram ambos os mecanismos. Ou seja, através da divisão e evaporação das gotas contendo um excesso de cargas (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) os íons são transferidos para a fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massas por um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons e entrada de moléculas neutras para o espectrômetro de massas [47].

Assim como as fontes de ionização, diversos também são os tipos de analisadores aos quais tem a finalidade de separar os íons de acordo com a sua razão massa carga (m/z) e transmiti-los até o detector. A escolha do melhor tipo de analisador depende da resolução desejada, do intervalo de massas a ser analisado e do limite de detecção para cada aplicação [48].

Como exemplos de analisadores de transmissão, o mais comum é o Quadrupolo Simples (Single Quadrupole) ao qual fornece o espectro de massas de cada pico cromatográfico eluído de um cromatógrafo líquido [48]. Outro exemplo deste grupo é o Triplo Quadrupolo (Q) que, embora não seja o mais comum, é o mais utilizado para doseamentos analíticos e bioanalíticos, ao qual possui, adicionalmente, fundamental importância na identificação de compostos [48, 49].

Os analisadores tipo triplo quadrupolo são relativamente baratos, compactos, rápidos e de alta eficiência de transmissão e consistem basicamente em quatro barras cilíndricas dispostas simetricamente umas das outras. Dentro do espectrômetro de massas, um campo elétrico acelera os íons para fora da fonte de ionização e para dentro dos quadrupolos. A transmissão se dá através de uma rádio frequência e uma corrente de voltagem aplicada aos eletrodos a qual oscila o campo elétrico funcionando como um filtro, transmitindo até o detector somente a m/z selecionada [48].

A grande vantagem desta técnica está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas e recursos *tandem* (MS-MS). Devido a excelência deste recurso, a espectrometria de massas teve um aumento considerável de aplicações na última década, principalmente nas áreas de bioquímica, genética, farmacologia e proteômica as quais contribuíram para aumento exponencial de publicações da literatura médica e da química clínica [50].

O analisador do tipo triplo quadrupolo possui dois sistemas seletivos de filtros de massas aos quais são dispostos em série sequenciais. Íons de particular massa/carga (precursores) são selecionados em um primeiro filtro de massas sendo direcionados para uma câmara de colisão, onde se chocam com um gás inerte formando íons fragmentos. Isto aumenta significativamente a especificidade da detecção de uma determinada molécula, pois os fragmentos dos íons formados são característicos para cada composto, o que permite definir adicionalmente, a classe de cada molécula precursora, uma vez que os íons fragmentos são característicos de cada classe de compostos [50].

Após a passagem dos íons pelo analisador estes são transmitidos até o detector, gerando um sinal através da formação de elétrons secundários que são amplificados, ou induzindo uma corrente gerada por uma carga móvel. Vários tipos de detectores para espectrômetros de massas estão disponíveis no mercado sendo o mais comum o multiplicador de elétrons. Os critérios mais importantes que distingue diferentes tipos de

detecção de íons são a sensibilidade, a precisão e o tempo de resposta. Um multiplicador de elétrons, por exemplo, apresenta resposta rápida em sistemas acoplados a cromatografia, permitindo varreduras de massas de 50-500 Da em 0,1 segundo [48].

Os quadropolos fazem uma análise de massas discriminatória, portanto são pouco sensíveis, e geralmente a sua resolução é unitária, embora o aumento do comprimento das barras pode melhorar a resolução. Em geral podem medir m/z até 2000 no máximo. Mas, por ter seu baixo custo, tamanho pequeno e fazer varreduras rápidas, são frequentemente usados como detectores acoplados a sistemas de HPLC [47].

A Figura 3 traz um esquema simplificado um analisador de massas quadrupolar.

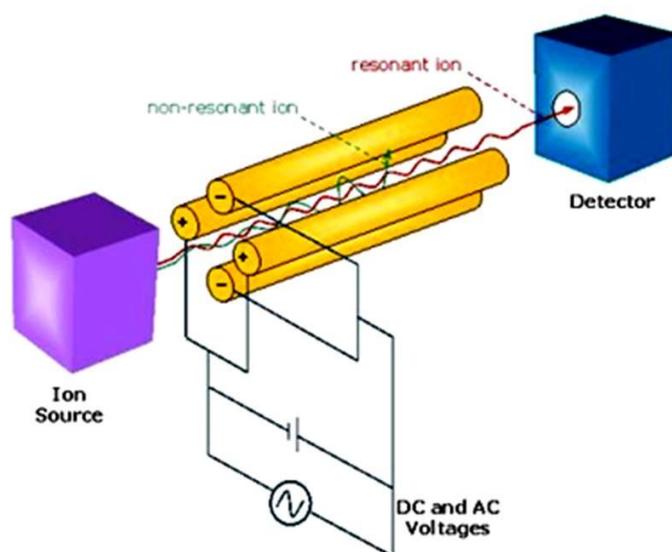


Figura 3: Esquema simplificado de um analisador de massas quadrupolar.

1.3.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Assim como houve uma evolução dos detectores utilizados em cromatografia líquida, a própria técnica também evoluiu devido à necessidade de análises mais rápidas e com bom desempenho cromatográfico, levando ao desenvolvimento da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês *“Ultra-High Performance Liquid Chromatography”* - UHPLC).

A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, porém utiliza colunas cromatográficas de dimensões reduzidas (5 a 10 cm de comprimento e 1 a 2,1 mm de diâmetro interno), recheadas com partículas de fase estacionária menores que 2 µm. A redução no tamanho das partículas da fase estacionária e as altas velocidades lineares de fase móvel aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo de análise, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. A pressão que o sistema de UHPLC atinge chega a 15000 psi [51, 52].

Em termos de instrumentação, as modificações requeridas para que um equipamento de UHPLC possa ser empregado com alto desempenho cromatográfico vão além da capacidade de trabalhar a elevadas pressões [52, 53]. É necessário também um sistema de bombeamento robusto, um sistema rápido de injeção que seja exato e preciso na faixa de volumes pequenos volumes, volumes internos reduzidos, detectores com alta taxa de aquisição de dados e colunas e fases estacionárias adequadas [51, 52].

O desenvolvimento dos detectores foi um fator importante para a expansão da UHPLC. Detectores capazes de adquirir e processar os dados suficientemente rápido para serem compatíveis com os picos estreitos resultantes. Desde a introdução da técnica, detectores ópticos, UV-VIS e por arranjo de diodos, com as modificações necessárias, volume da cela do detector reduzido e longo caminho óptico, foram disponibilizados e comercializados para serem empregados nas determinações por UHPLC. Atualmente, o acoplamento da UHPLC com a espectrometria de massas já está bem consolidado, permitindo que as mais diversas áreas de aplicação tenham acesso ao emprego da técnica [52, 54, 55].

As principais vantagens da UHPLC são: diminuição no tempo de análise, melhor resolução e detectabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos [51, 52].

Diante disso, o presente trabalho buscou, principalmente, realizar um estudo de estabilidade dos extratos hidroalcoólicos das duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) conforme preconiza o Guia para a realização de Estudos de Estabilidade Resolução - RE nº. 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA. Um método analítico foi desenvolvido e validado nesta pesquisa, para quantificar o teor do principal

marcador químico da espécie, a cumarina, utilizando a técnica de UHPLC-ESI-MS, bem como o teor de outro composto encontrado em *M. glomerata*, o ácido clorogênico. Este método também foi aplicado na quantificação destes compostos em amostras disponíveis comercialmente, bem como em amostras cultivadas em diversas regiões do Brasil.

2 OBJETIVOS

Diante da falta de estudos que avaliem a estabilidade dos extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, preparados de acordo com as normas farmacopeicas, o objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata* de acordo com o previsto no Guia para a realização de Estudos de Estabilidade Resolução - RE nº. 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA, acompanhando o teor do marcador químico, a cumarina e propor seu prazo de validade. O perfil cromatográfico das amostras foi acompanhado para avaliar a possibilidade de haverem outras substâncias que possam ser utilizadas como marcadores químicos destas espécies, como o ácido clorogênico.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar se o método de secagem das drogas vegetais (estufa ou liofilização) afeta o teor de cumarina e ácido clorogênico nas drogas vegetais e nos extratos;
- ✓ Avaliar se a incidência de luz durante o armazenamento dos extratos, à temperatura ambiente, afeta o teor de cumarina e ácido clorogênico dos extratos;
- ✓ Desenvolver e validar de um método por UHPLC-ESI-MS para quantificação de cumarina e ácido clorogênico, segundo orientações da RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA;
- ✓ Analisar amostras de extratos e tinturas identificadas como guaco, disponíveis comercialmente, avaliando-se o teor de cumarina e ácido clorogênico presente nas amostras;
- ✓ Analisar amostras de drogas vegetais e plantas frescas identificadas como guaco, avaliando-se o teor de cumarina e de ácido clorogênico presentes nas amostras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- ✓ Estufa com circulação de ar Fanen[®] modelo 002/3
- ✓ Liofilizador Liotop[®] modelo L101
- ✓ Moinho de bancada IKA[®] modelo A11 basic
- ✓ Agitador tipo mesa New Brunswick Scientific[®] series 25
- ✓ Banho ultrassônico
- ✓ Tamis Solotest[®]
- ✓ Balança analítica
- ✓ Balança semi-analítica BEL Engineering[®] modelo Mark 500
- ✓ Cromatógrafo a Líquido de Ultra Eficiência - UPLC - TQD Acquity (Wates - USA) acoplado a Espectrômetro de massas TQD ESI Acquity (Wates - USA)

3.2 Reagentes químicos

- ✓ Álcool etílico grau PA (Ecibra[®])
- ✓ Ácido fórmico 85% grau PA (Synth[®])
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker[®])
- ✓ Padrão de cumarina (Sigma Aldrich[®])
- ✓ Padrão de ácido clorogênico (Sigma Aldrich[®])

3.3 Coleta e preparo do material vegetal

O presente trabalho foi realizado com exemplares de *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas no campo experimental do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp. Estes exemplares são provenientes de mudas do campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp – CPQBA – Unicamp (Paulínia – SP) cujas exsicatas estão depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas sob registro nº 102046 para a *M. laevigata* e nº 102047 para a *M. glomerata*. Em fevereiro de 2011, folhas das duas espécies foram coletadas, no período da manhã e passaram pelo processo secagem, pulverização e posterior armazenamento a 22 °C ao abrigo da luz.

O processo de secagem das folhas foi realizado de duas formas: o primeiro grupo de cada espécie foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 50 horas. Já o segundo grupo foi congelado em ultrafreezer a 40 °C por 12 horas, seguido de secagem em liofilizador por 50 horas. As folhas secas através destes dois procedimentos foram trituradas em moinho de bancada e tamisadas a fim de se obter a droga vegetal com granulometria inferior a 0,84 mm, sendo esta utilizada para o preparo dos extratos, conforme ilustra a Figura 4.

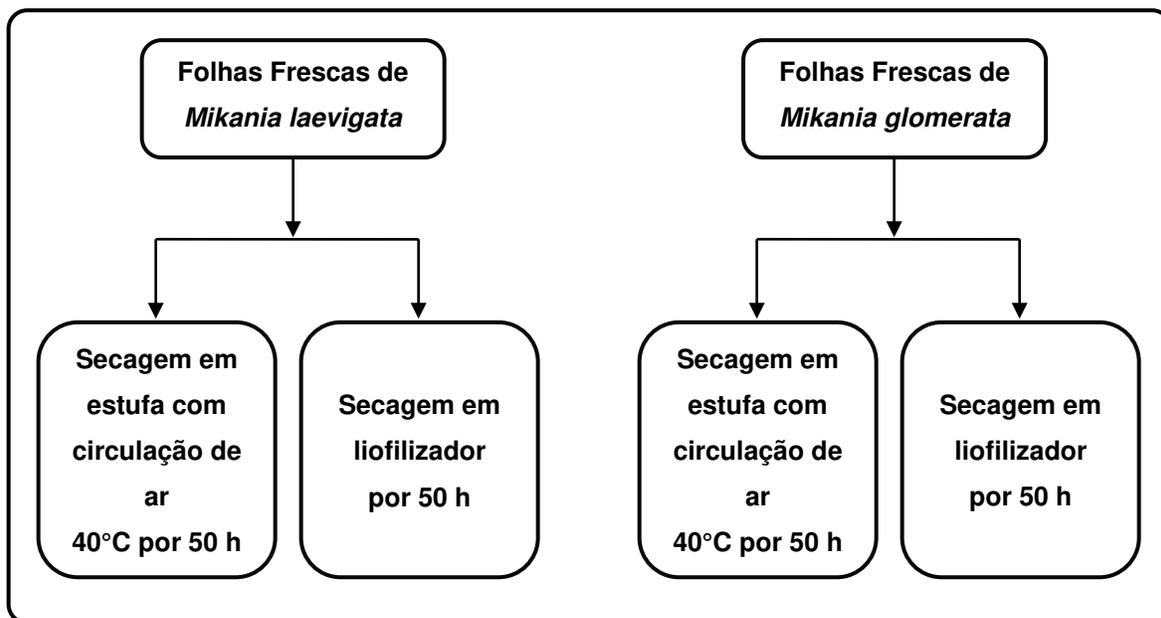


Figura 4: Esquema do processo de secagem das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

3.4 Preparo dos Extratos Hidroalcoólicos

O preparo dos extratos hidroalcoólicos foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 1ª edição (1929) [8], seguindo a proporção:

Guaco, folha, em pó.....	200 g
Solução hidroalcoólica.....	q.s.p
Para obter.....	1000 mL

A extração foi realizada por maceração, utilizando como líquido extrator uma mistura de dois volumes de álcool etílico grau PA com um volume de água deionizada (aproximadamente 666,67 mL de álcool etílico e 333,33 mL de água) sob agitação, em mesa agitadora, por 72 horas, com renovação do líquido extrator a cada 24 horas (um total de 3 renovações).

3.5 Determinação do teor de sólidos

Uma alíquota de 10 mL dos extratos foi seca em estufa a 105 °C até peso constante para determinar a quantidade de sólidos extraídos.

3.6 Análise Cromatográfica por UHPLC-MS

Foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido de Ultra Eficiência – UPLC® Acquity da Waters com uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm) com temperatura do forno em 30 °C. A eluição foi feita por gradiente com fluxo de 200 µL min⁻¹, utilizando como fase móvel A água purificada (Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e como fase móvel B acetonitrila (grau cromatográfico), de acordo com o sistema de gradiente mostrado na Tabela 3. Foram injetados 2 µL de cada amostra, que ficaram armazenadas no auto injetor do equipamento a 20 °C.

Tabela 3: Gradiente utilizado para avaliação cromatográfica.

Tempo (min)	% eluente A (água purificada com 0,1 % de ácido fórmico)	% eluente B (acetonitrila)
Inicial	90	10
4,00	75	25
8,00	0	100
8,50	0	100
8,51	90	10
10,00	90	10

A fase móvel utilizada foi a mais adequada, desenvolvida com base no trabalho de Celeghini *et al*, 2001 [20] que utiliza acetonitrila:água (40:60 v/v).

A detecção foi feita por um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (TQD-Acquity da Waters) com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI), realizando varredura em modo positivo e modo negativo nas seguintes condições: capilar de ± 3000 V, cone de ± 35 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C.

3.6.1 Análise do teor de cumarina e de ácido clorogênico e análise do perfil cromatográfico dos extratos

Alíquotas dos extratos diluídos na proporção de 1:2 extrato:água foram analisadas por UHPLC com detecção por espectrometria de massas durante o período de duração de cada estudo de estabilidade. Nas análises, foi quantificado o teor de cumarina e de ácido clorogênico comparando a área dos picos com uma curva de calibração construída a partir da diluição seriada de uma solução estoque de padrões preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em solução de álcool etílico:água 70:30 (v/v).

As análises foram realizadas seguindo as condições cromatográficas descritas no item 3.6. A tabela 4 traz informações físico-químicas destes dois analitos.

Tabela 4: Informações físico-químicas dos compostos cumarina e ácido clorogênico.

Propriedade	Cumarina	Ácido clorogênico
CAS number	91-64-5	327-97-9
Sinônimos	cumarin, 1,2-Benzopyrone, 2H-1-Benzopyran-2-one, 2H-Chromen-2-one	3-Caffeoylquinic acid, Chlorogenate, Hlorogenic acid, 3-O-Caffeoylquinic acid, Heriguard, 3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)quinic acid
peso molecular	146.14274 g/mol	354.30872 g/mol
Formula molecular	C ₉ H ₆ O ₂	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Cor/Forma	crístais brancos	-
odor	odor perfumado semelhante a grãos de baunilha	-
ponto de ebulição	301,71 °C	665,0 °C
ponto de fusão	71 °C	210 °C
densidade	0,935 g/mL	1,65 g/mL
coeficiente de partição octanol/água (logP)	1,39	0.370
solubilidade	solúvel em etanol; muito solúvel em éter e clorofórmio; muito solúvel em óleos; solúvel em água (1,900 mg/L a 20 °C)	-

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Acesso em 15/06/2013)

3.7 Validação do método analítico para a quantificação de cumarina nos extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* por UHPLC-ESI-MS.

A validação do método cromatográfico desenvolvido para a quantificação da cumarina e do ácido clorogênico foi realizado com base nos critérios da RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA [56], avaliando-se os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, seletividade e precisão. Avaliou-se também o efeito de matriz.

3.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela injeção em UHPLC-ESI-MS/MS de uma solução padrão de cumarina e de ácido clorogênico, preparadas em solução de álcool etílico:água 70:30 (v/v), injeção dos extratos hidroalcoólicos (diluídos em água deionizada na proporção 1:2 extrato:água) das duas espécies de *Mikania* e injeção destes mesmos extratos com a adição dos padrões de cumarina e de ácido clorogênico. Nestas injeções avaliaram-se o tempo de retenção dos padrões, comparado com estes compostos identificados nos extratos e a fragmentação do íon de razão massa/carga (m/z) 147, em modo positivo, correspondente a cumarina e m/z 353, em modo negativo, correspondente ao ácido clorogênico.

3.7.2 Efeito de matriz

Avaliou-se o efeito da matriz sobre os analitos de acordo com Economou *et al.* [57], através da Equação 1:

$$C\% = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad (1)$$

Onde: C% é a porcentagem de aumento ou supressão de sinal;

S_m é o coeficiente angular da curva analítica construída na matriz;

S_s é o coeficiente angular da curva analítica construída no solvente.

3.7.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pelos coeficientes de correlação das curvas analíticas construídas pela injeção de soluções dos padrões de cumarina e de ácido clorogênico preparadas no extrato hidroalcoólico de *Mikania glomerata* diluído em água na proporção 1:2. O extrato utilizado na avaliação desta figura de mérito foi preparado com uma amostra de *Mikania glomerata* (Figura 5) obtida na cidade de Ubatuba – SP,

região do litoral norte do estado de São Paulo e identificada pelo Prof. George Y. Tamashiro do Instituto de Biologia da Unicamp. Nesta amostra foram encontrados teores de cumarina e de ácido clorogênico abaixo dos limites de quantificação, por esse motivo seu extrato foi adotado como matriz isenta dos analitos para a validação do método analítico.

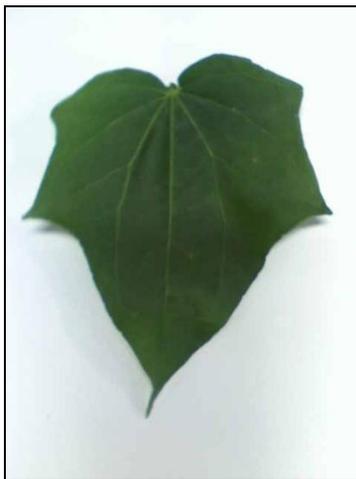


Figura 5: Folha da amostra de *M. glomerata* obtida em Ubatuba - SP.

3.7.4 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através da injeção de soluções do padrão de cumarina e de ácido clorogênico preparadas na matriz isenta dos analitos (*M. glomerata* litoral). O LD foi estabelecido como a concentração que gerou uma razão sinal/ruído igual a 3 (S/N 3:1) e o LQ como a concentração que gerou uma razão sinal/ruído igual a 10 (S/N 10:1).

3.7.5 Precisão

Foi avaliada a precisão intra-dia, utilizando extratos hidroalcoólicos de *M. laevigata* e *M. glomerata*, foram preparadas cinco diluições, na proporção 1:2, de cada extrato em água deionizada e adicionados em *vials* separados para injeção, utilizando os parâmetros descritos no item 3.6. Os valores de área da cumarina (detectada como m/z 147 – ESI modo positivo) e de ácido clorogênico (m/z 353 – ESI modo negativo) foram acompanhados.

3.7.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação (R) adicionando-se as concentrações de cumarina de 30 (baixa), 150 (média) e 400 (alta) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de ácido clorogênico na concentração de 30 (baixa), 100 (média) e 400 (alta) $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata, no extrato preparado das duas espécies de *Mikania*. O procedimento utilizado foi semelhante ao preparo de uma curva analítica na matriz. Realizou-se o cálculo da recuperação através da seguinte equação (Equação 2):

$$R (\%) = (C1 - C2) / C3 \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C1 é a concentração determinada na amostra fortificada.

C2 é a concentração determinada na amostra não fortificada.

C3 é a concentração de fortificação.

3.8 Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade foi conduzido através da análise dos extratos hidroalcoólicos obtidos, sendo estes mantidos em estufa com temperatura controlada. Por se tratar de um extrato hidroalcoólico, este estudo foi conduzido utilizando os parâmetros das formas farmacêuticas líquidas com embalagem primária impermeável em vidro, não sendo fixada a umidade do ambiente, conforme conta no Guia para a realização de Estudos de Estabilidade Resolução - RE nº. 1, de 29 de julho de 2005. Portanto os extratos foram armazenados nas seguintes condições:

- a temperatura ambiente de 22 °C, com incidência de luz, por 12 meses;
- a temperatura ambiente de 22 °C, sem incidência de luz, por 12 meses;
- a temperatura de 40 °C (± 2 °C) para o estudo de Temperatura Acelerado por 6 meses;
- a temperatura de 30 °C (± 2 °C) para o estudo de Temperatura – Longa Duração, por 12 meses.

Na Tabela 5 está descrito como foi conduzido o estudo de estabilidade dos extratos.

Tabela 5: Estudo de estabilidade dos extratos de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Período	Temperatura de armazenamento		
3 meses	22 °C*	30 °C	40 °C
6 meses	22 °C*	30 °C	40 °C
12 meses	22 °C*	30 °C	-

*os testes foram conduzidos à temperatura ambiente de 22 °C também foram armazenados na presença ou ausência de luz.

Após o período de armazenamento o volume inicial dos extratos foi completado com uma solução de etanol 70% a, a seguir, os extratos foram diluídos em água purificada (Milli-Q) na proporção de 1:2 extrato:água, antes da análise por UHPLC-MS.

3.8.1 Tratamento estatístico dos dados obtidos no Estudo de Estabilidade

Para a análise dos dados, utilizou-se o programa GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (Microsoft), GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão e foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P = 0,05$ %).

3.9 Aplicação do método analítico para análise de diferentes amostras

3.9.1 Amostras comerciais

Foram obtidas diversas amostras comerciais de drogas vegetais e tinturas de guaco, conforme mostra a Tabela 6. Foram avaliados os teores de cumarina e de ácido clorogênico nestas amostras, conforme descrito no item 3.6.

Tabela 6: Amostras comerciais de drogas vegetais e extratos de guaco.

Identificação da amostra	Apresentação	Obtenção	Demais informações
Guaco	Droga vegetal	Mercado Municipal de Porto Alegre – RS	Fabricação 20/07/2012 Validade 36 meses
Guaco – <i>Mikania Guaco</i>	Droga vegetal	Mercado Municipal de Porto Alegre – RS	Produção em Porto Alegre - RS
Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Loja de produtos naturais em Florianópolis – SC	Produção em Palhoça – SC Fabricação 20/07/2012 Validade 2 anos
Guaco – <i>Mikania guaco</i>	Droga vegetal	Manaus - AM	Fabricação 08/12/2010 Validade 08/12/2013
<i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia Viva – Brasília – DF	Coleta 30/08/2012 Moagem 05/09/2012
Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	Fabricação 11/2011 Validade 18 meses
Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	Validade 02/2013
Guaco – <i>Mikania glomerata</i> Spreng	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	Validade 22/03/2013
Tintura de guaco	Tintura	Farmácia de Manipulação – Atibaia – SP	-
Tintura mãe de guaco	Tintura	Amostra grátis obtida através de distribuidora de matéria-prima	Fabricação 04/04/2011 Validade 04/04/2013
Extrato Fluido de Guaco	Extrato	Amostra grátis obtida através de distribuidora de matéria-prima	Fabricação 01/03/2011 Validade 01/03/2013

Para as drogas vegetais, foram realizados extratos hidroalcoólicos seguindo o procedimento descrito no item 3.4. Os extratos das drogas vegetais foram preparados após 30 dias da data de aquisição destas, em média, estando todas dentro do prazo de validade até este momento. Todas as amostras tiveram seu teor de cumarina e de ácido clorogênico avaliados conforme condições cromatográficas descritas no item 3.6.

3.9.2 Amostras cultivadas

Foram obtidas amostras de plantas frescas *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas em diferentes localidades. A Tabela 7 traz as informações sobre elas.

Tabela 7: Amostras de guaco cultivadas em diferentes localidades.

Identificação da amostra	Apresentação	Obtenção	Local de produção
<i>M. glomerata</i> - Clone 1	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. glomerata</i> - Clone 2	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. glomerata</i> - Clone 3	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. glomerata</i> - 1	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. glomerata</i> – 2	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. glomerata</i> – 3	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
<i>M. laevigata</i> - 1	Folhas frescas	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP
Guaco	Folhas frescas	Muda residencial	Guarapuava – PR
Guaco	Folhas frescas	Muda residencial	João Pessoa – PB
Guaco	Folhas frescas	Muda residencial	São Paulo – SP

O processo de secagem para estas amostras foi somente por liofilização e procedeu-se o preparo dos extratos conforme descrito no item 3.4. Todas as amostras tiveram seu teor de cumarina e de ácido clorogênico avaliado conforme condições cromatográficas descritas no item 3.6. As amostras cultivadas no CPQBA – Unicamp foram coletadas no mês de março de 2012, no período da manhã.

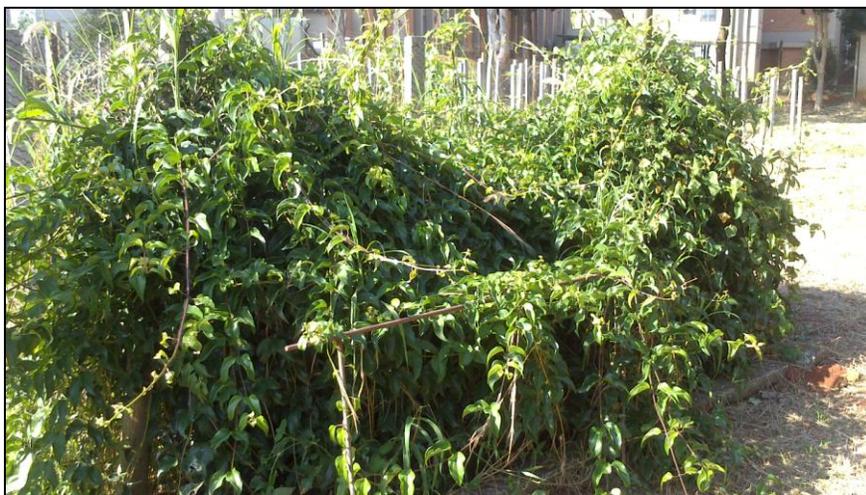
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta, preparo do material vegetal e extratos.

As folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* cultivadas no campo experimental do Instituto de Biologia – Unicamp (Figura 6 e Figura 7) foram utilizadas para o preparo dos extratos conforme descreve os itens 3.3 e 3.4.



(A)



(B)

Figura 6: Foto das espécies cultivadas no campo experimental do IB- Unicamp: *Mikania glomerata* (A); *Mikania laevigata* (B).

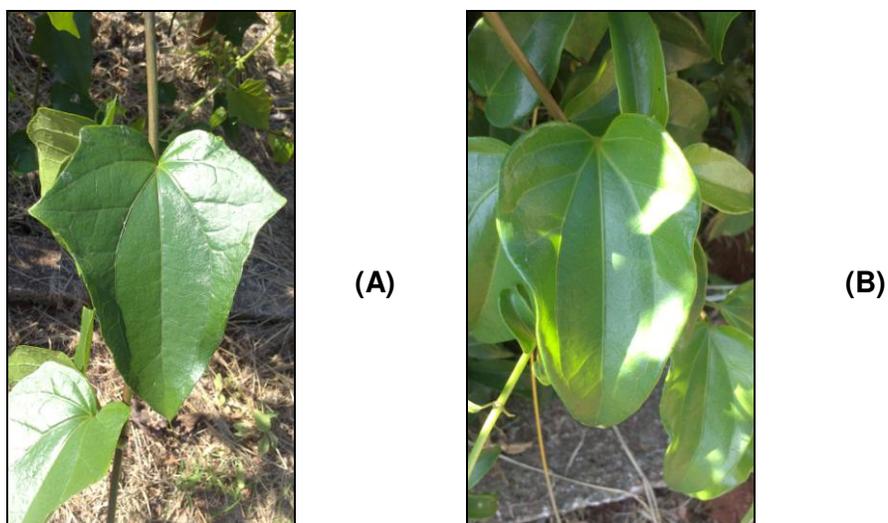


Figura 7: Detalhe para o formato das folhas de *M. glomerata* (A) e *M. laevigata* (B).

4.2 Análise inicial dos extratos

4.2.1 Teor de sólidos

O rendimento do processo de secagem das folhas e o teor de sólidos dos extratos estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8: Rendimento do processo de secagem das folhas e de resíduos sólidos dos extratos preparados para o estudo de estabilidade.

Amostra/ forma de secagem	Massa de folhas frescas (g)	Massa de folhas secas (g)	% rendimento folhas secas	% Perda de água	% resíduos sólidos (m/v)
<i>M. laevigata</i> seca em estufa (MIE)	95,0	13,0	13,7	86,3	1,2
<i>M. laevigata</i> seca em liofilizador (MIL)	95,0	13,6	14,3	85,7	1,3
<i>M. glomerata</i> seca em estufa (MgE)	126,4	31,4	24,8	75,2	1,3
<i>M. glomerata</i> seca em liofilizador (MgL)	125,5	30,9	24,6	75,4	1,4

Fazendo uma comparação entre as formas de secagem das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*, não se verifica uma grande diferença em relação aos rendimentos de folhas secas e nem na porcentagem de resíduos sólidos após o preparo dos extratos. Sendo assim, a forma de secagem não exerce influência no rendimento de folhas secas nem na quantidade de resíduos sólidos dos extratos obtidos.

4.2.2 Análise cromatográfica preliminar dos extratos

Após o preparo dos extratos, estes foram analisados por cromatografia para verificar o perfil químico das amostras. A detecção foi feita por ESI-MS, realizando uma varredura em modo positivo e modo negativo nas condições: capilar de ± 3000 V, cone de ± 35 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 150°C e temperatura de dessolvatação de 300°C . Nessa avaliação inicial, foi utilizado um método cromatográfico diferente do validado (item 3.6) resultando em variação nos tempos de retenção descritos mais adiante.

O perfil cromatográfico obtido pode ser observado nas Figuras 8 e 9.

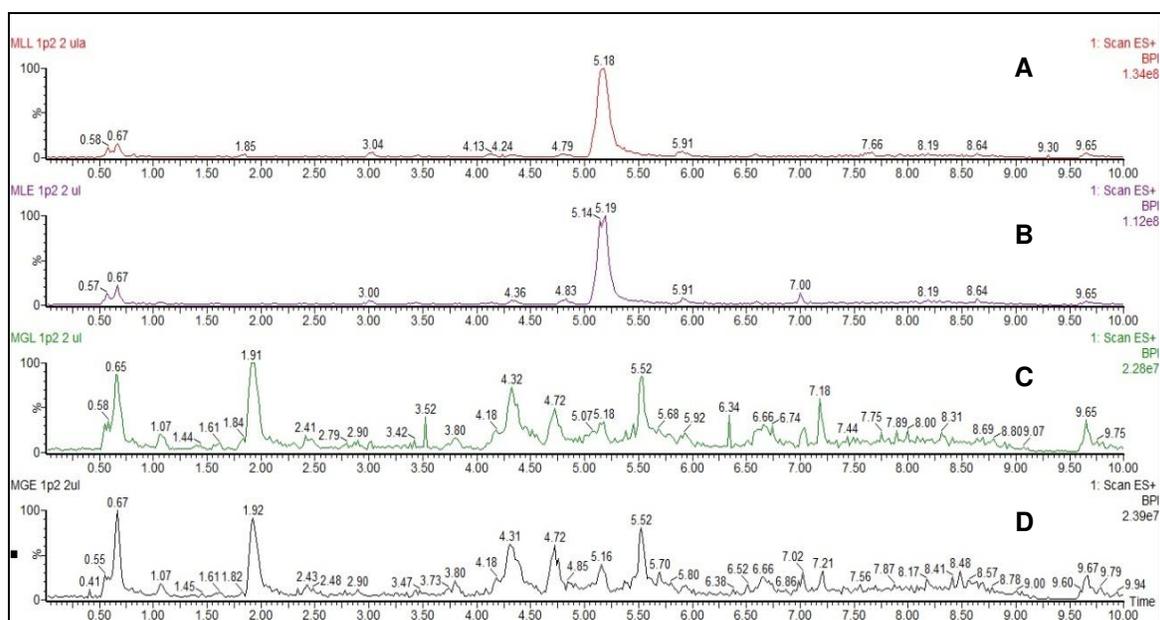


Figura 8: Cromatogramas obtidos com detecção por ESI-MS em modo positivo dos extratos das folhas de *Mikania laevigata* secas em liofilizador (A), *Mikania laevigata* secas em estufa (B), *Mikania glomerata* secas em liofilizador (C) e *Mikania glomerata* secas em estufa (D).

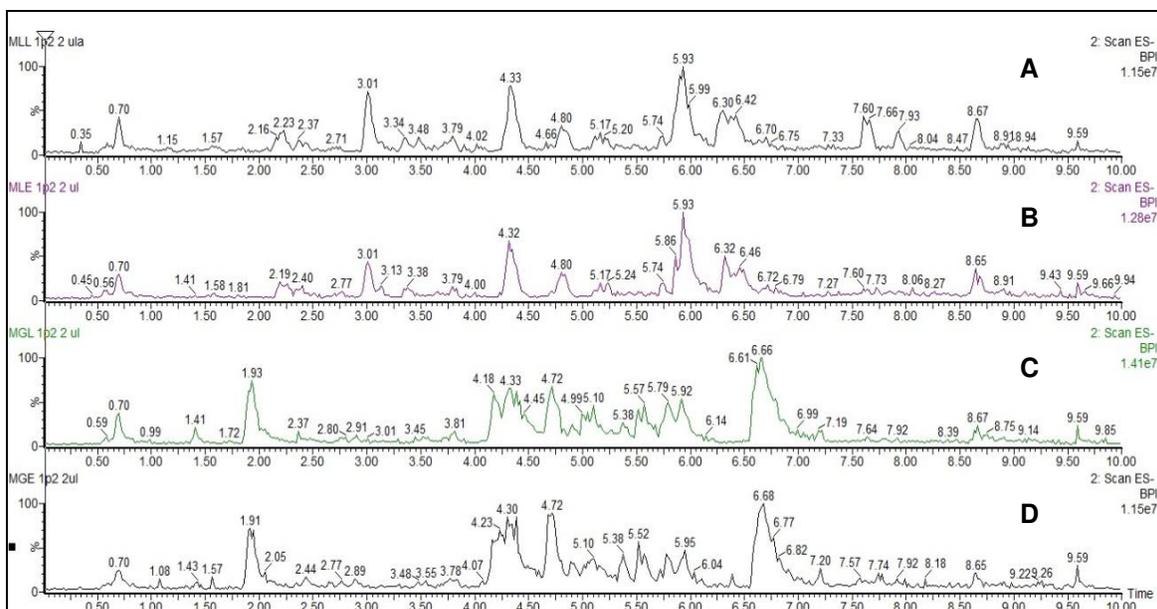


Figura 9: Cromatogramas obtidos com detecção por ESI-MS em modo negativo dos extratos das folhas de *Mikania laevigata* secas em liofilizador (A), *Mikania laevigata* secas em estufa (B), *Mikania glomerata* secas em liofilizador (C) e *Mikania glomerata* secas em estufa (D).

Observando as Figuras 8 e 9 pode-se verificar que o perfil cromatográfico das duas amostras de *M. laevigata* foram semelhantes entre si, independente do modo de secagem das folhas, o que também aconteceu com a *M. glomerata*, o modo de secagem das folhas não interferiu no perfil químico observado na análise cromatográfica.

Porém observa-se que selecionando o íon de m/z 147, em modo positivo, referente à cumarina, e o íon de m/z 353 em modo negativo, referente ao ácido clorogênico, as espécies mostram-se diferentes entre si. Comparando o cromatograma dos padrões de cumarina e ácido clorogênico (Figura 10) com o cromatograma das amostras, observa-se que a *M. laevigata* apresenta um pico com tempo de retenção (tR) semelhante ao padrão de cumarina (tR de aproximadamente 5,1 minutos) e a *M. glomerata* não apresenta. O oposto ocorre com o ácido clorogênico, observa-se um pico intenso na *M. glomerata* com o mesmo tR do ácido clorogênico, e não se observa um pico intenso no tR da cumarina (Figuras 11 e 12). Além da comparação com o tempo de retenção, é possível comparar os íons dos padrões com os íons das amostras, conforme mostra a Figura 13.

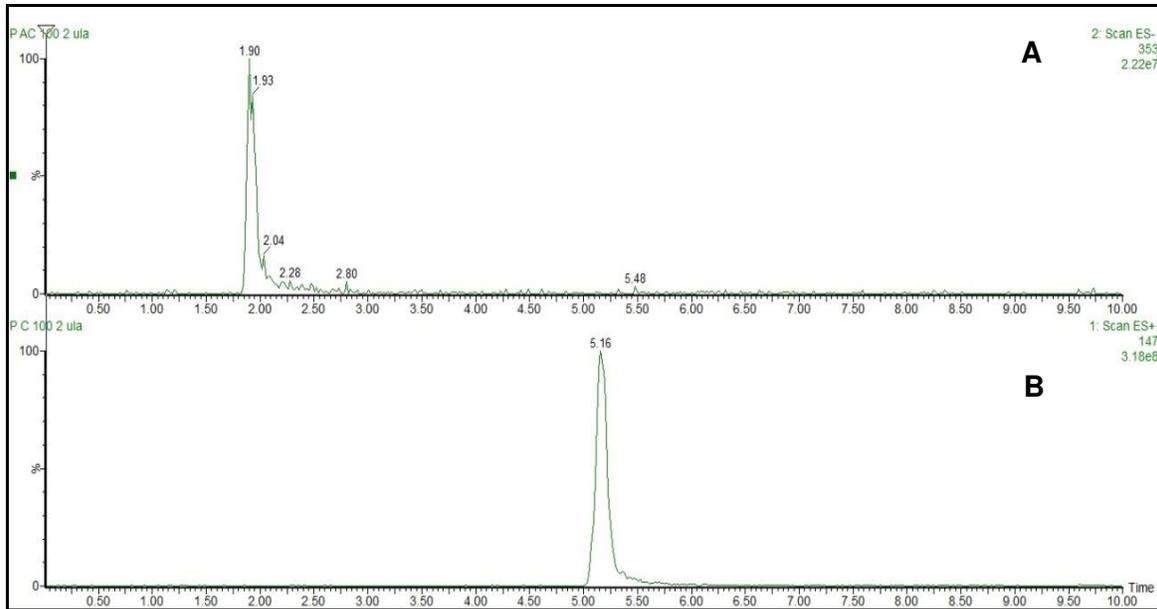


Figura 10: Cromatograma com detecção por ESI-MS dos padrões de ácido clorogênico (A) em modo negativo (m/z 353) e cumarina (B) em modo positivo (m/z 147).

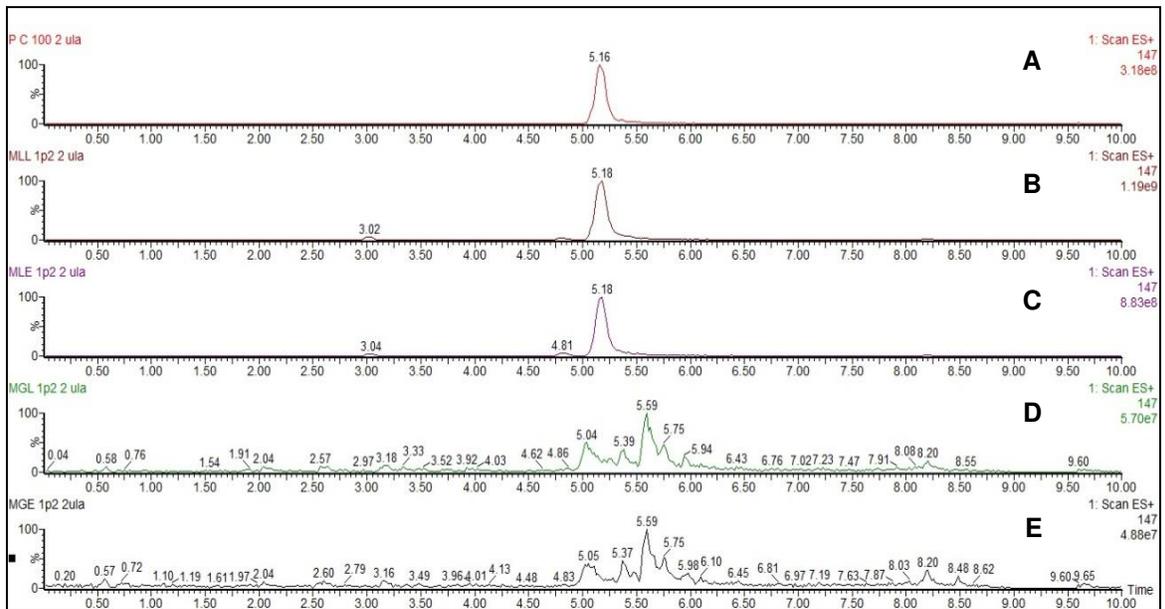


Figura 11: Cromatograma com detecção por ESI-MS do padrão de cumarina (A), dos extratos das folhas de *M. laevigata* secas em liofilizador (B), *M. laevigata* secas em estufa (C), *M. glomerata* secas em liofilizador (D) e *M. glomerata* secas em estufa (E). Modo positivo (m/z 147).

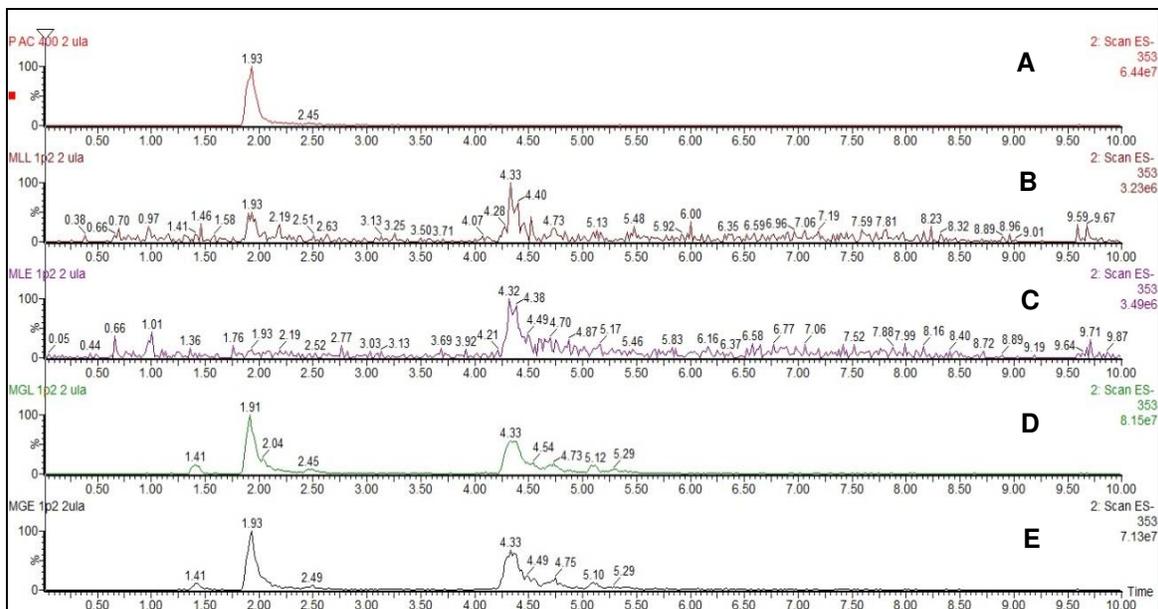


Figura 12: Cromatograma com detecção por ESI-MS do padrão de ácido clorogênico (A), extrato das folhas de *M. laevigata* secas em liofilizador (B), *M. laevigata* secas em estufa (C), *M. glomerata* secas em liofilizador (D) e *M. glomerata* secas em estufa (E). Modo negativo (m/z 353).

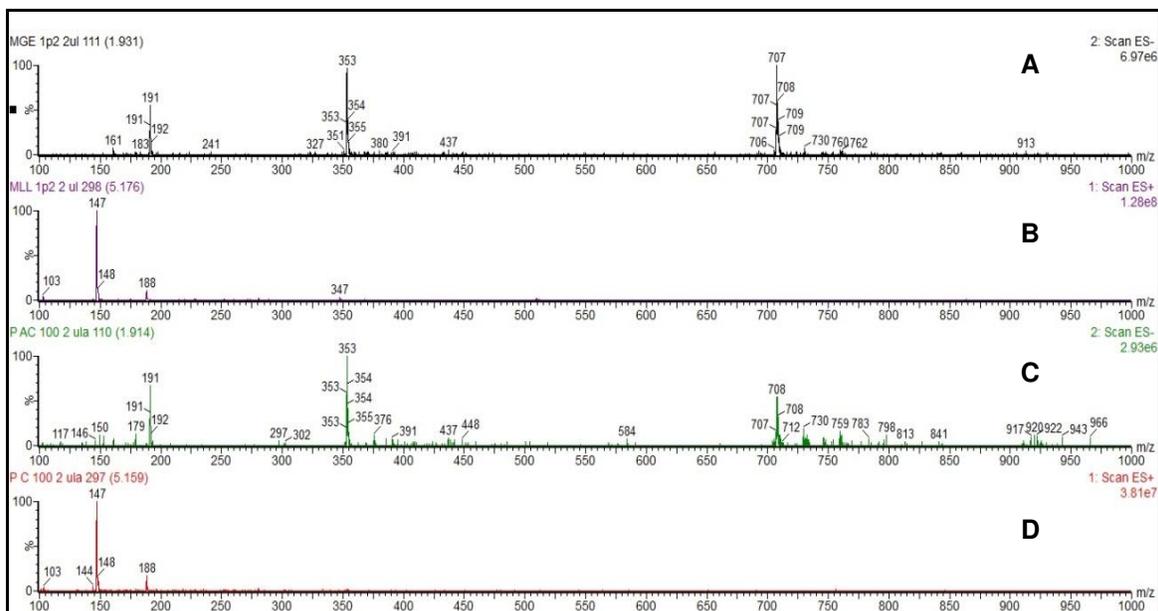


Figura 13: Íon observado no pico de tR de aproximadamente 1,90 minutos com m/z 353 observado na *M. glomerata* (A) e íon observado no pico de tR de aproximadamente 5,18 minutos com m/z 147 observado na *M. laevigata* (B). Espectro de massas do padrão de ácido clorogênico (C) e do padrão de cumarina (D).

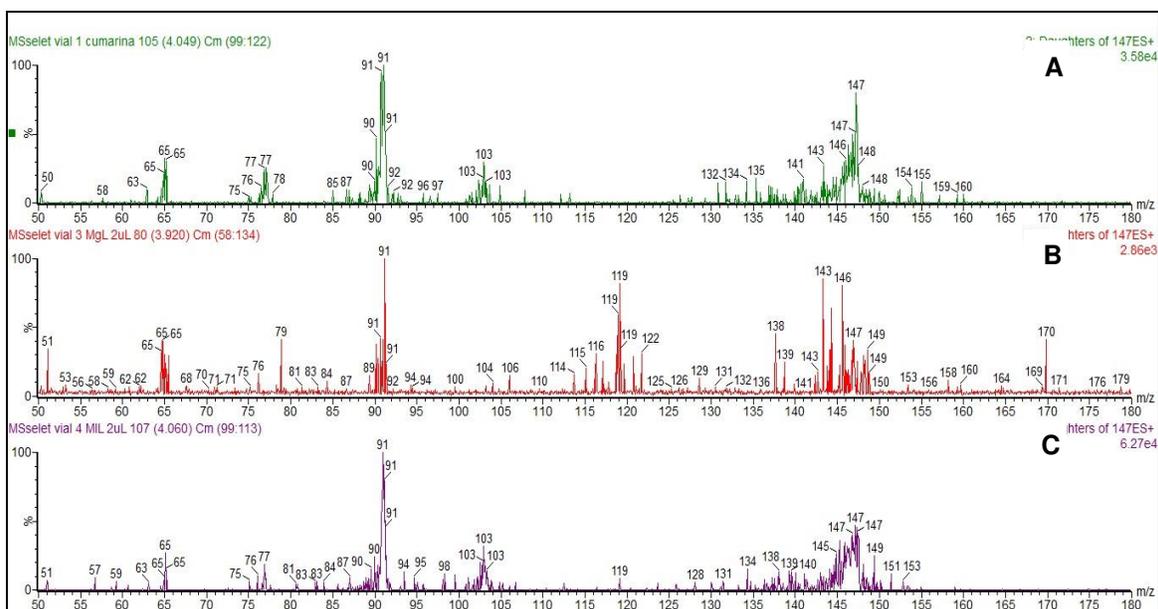


Figura 14: Espectros de massas (MS/MS) do padrão de cumarina (A), extrato das folhas de: *M. glomerata* secas em liofilizador (B), *M. laevigata* secas em liofilizador (C). Modo positivo (m/z 147).

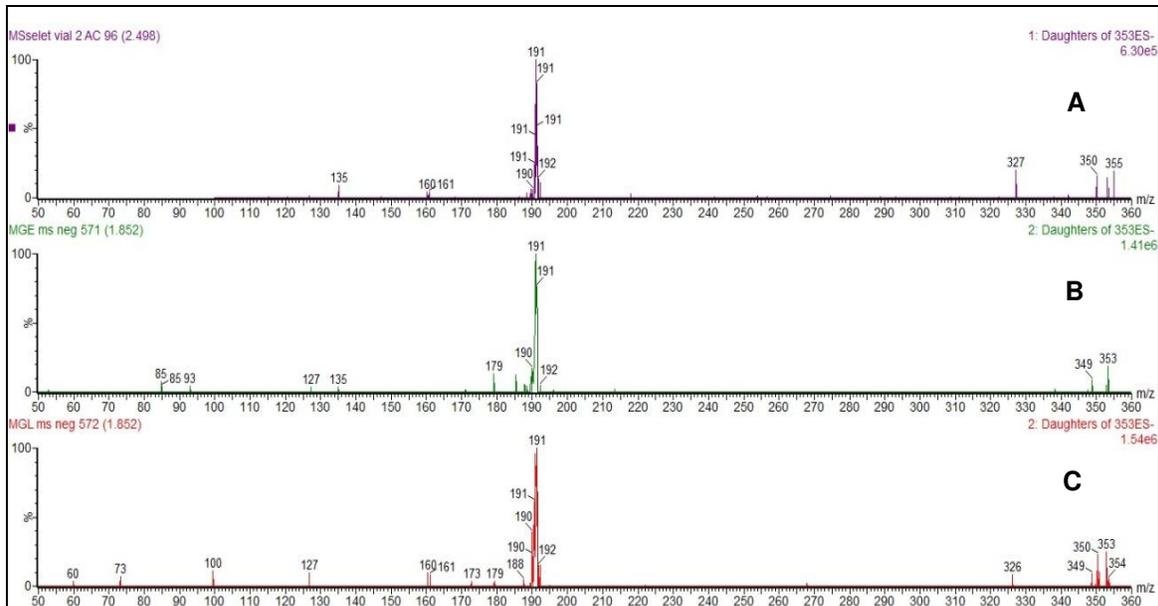


Figura 15: Espectros de massas (MS/MS) do padrão de ácido clorogênico (A), extrato das folhas de *M. glomerata* secas em estufa (B) e em liofilizador (C). Modo negativo (m/z 353).

* Não foi observado a m/z 353 referente ao ácido clorogênico nas amostras de *M. laevigata*.

Verificou-se que o composto com m/z 147 encontrado na amostra de *M. laevigata* apresenta o espectro de massas semelhante ao espectro de massas do padrão de cumarina m/z 147, sendo possível assim, confirmar a presença de cumarina nesta espécie. Já o composto com m/z 147 encontrado na amostra de *M. glomerata* apresentam intensidade menor que em *M. laevigata*, dificultando sua identificação, conforme mostra a figura 14.

Em relação ao ácido clorogênico (Figura 15) observa-se que a amostra de *M. glomerata* apresenta um composto com m/z 353 (B e C) que possui seu espectro de massas semelhante ao do padrão (A), sendo possível assim confirmar a presença do ácido clorogênico nesta espécie. No cromatograma das amostras de *M. laevigata* os picos de íons de m/z 353 foram pouco intensos.

Trabalhos encontrados na literatura trazem a cumarina como um composto presente em ambas as espécies utilizadas neste trabalho. Vilegas *et.al.* [15] descrevem a presença de cumarina em extrato hexânico das folhas de *M. glomerata* por Cromatografia Gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-FID). Veneziani *et.al.* [13] e Fierro *et.al.* [16] também descrevem a obtenção de cumarina, identificada por cromatografia em camada delgada (CCD) [13] e por espectrometria de massas (EI-MS) [16], no extrato etanólico de *M. glomerata* após fracionamento. Por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por ultravioleta e arranjo diodo (HPLC-UV/DAD) Celeghini *et.al.* [38] quantificou o teor de cumarina em extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata*. Já Santos *et.al.* [18] quantificaram o teor de cumarina em extratos aquosos e hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Porém, Yatsuda *et.al.* [12] analisaram a porcentagem relativa dos compostos identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) do extrato hidroalcoólico de ambas as espécies de *Mikania*. Eles encontraram 17,81% de cumarina em *M. laevigata* mas não detectaram cumarina no extrato hidroalcoólico de *M. glomerata*, apenas na fração acetato de etila de *M. glomerata*, em uma porcentagem relativamente baixa (1,43%).

Diante disso, observa-se uma variação na composição química das espécies estudadas, possivelmente devido a diferentes posições geográficas, temperatura de cultivo, sazonalidade e forma de preparo dos extratos. Assim como Yatsuda *et.al.* [12], o preparo do extrato hidroalcoólico por maceração, seguindo as instruções da Farmacopeia

Brasileira 1ª edição (1929) [8], não permitiu a identificação de cumarina na amostra de *M. glomerata* utilizada neste trabalho.

A presença de ácido clorogênico nas amostras não é nenhuma surpresa, já que este composto é amplamente distribuído no reino vegetal. Os derivados do ácido fenilacrílico, como o ácido clorogênico, são normalmente encontrados na forma de ésteres, glicosídeos e amidas, sendo o primeiro composto conhecido, dessa série, o ácido clorogênico. Sua fórmula estrutural está demonstrada na Figura 16 [58].

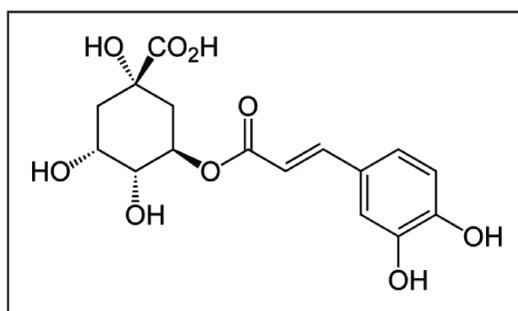


Figura 16: Fórmula estrutural do ácido clorogênico.

Silva *et.al.* [59] observaram presença do ácido clorogênico em amostras comerciais da droga vegetal de *M. glomerata*.

Como o ácido clorogênico foi encontrado nas amostras utilizadas neste trabalho, em quantidades diferentes entre as espécies, conforme mostra a Figura 12, este composto foi avaliado, sendo seu teor acompanhado durante o estudo de estabilidade.

4.2.2.1 Análise do teor de cumarina e ácido clorogênico

Após a avaliação qualitativa inicial dos extratos preparados, descrita no item 4.2.2., o teor da cumarina e do ácido clorogênico foram quantificados, comparando a área dos picos (injeção dos extratos após diluição 1:2 em água deionizada) com uma curva de calibração construída a partir da diluição seriada de uma solução estoque dos padrões, preparadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹ (de 1 ng.mL⁻¹ a 500 µg.mL⁻¹) em solução do extrato isento dos analitos de interesse.

Os valores obtidos estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9: Valor médio (n = 3) do teor de cumarina e ácido clorogênico encontrados nos extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Extrato	Teor de cumarina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Teor de ácido clorogênico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)
<i>M. glomerata</i> seca em estufa (MgE)	*	-	1348,02	19,94
<i>M. glomerata</i> seca em liofilizador (MgL)	*	-	1934,03	5,79
<i>M. laevigata</i> seca em estufa (MIE)	775,11	3,26	*	-
<i>M. laevigata</i> seca em liofilizador (MIL)	1131,74	0,61	*	-

* Valores abaixo do limite de quantificação.

4.3 Validação do método

Para validar o método analítico utilizado para quantificar o teor de cumarina e ácido clorogênico nas amostras de *M. glomerata* e *M. laevigata*, foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, efeito de matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os padrões de cumarina e ácido clorogênico com as amostras.

Comparou-se o tempo de retenção (tR) e a fragmentação do íon de m/z 147, em modo positivo, correspondente a cumarina e em modo negativo m/z 353, correspondente ao ácido clorogênico.

Avaliando-se a seletividade do método para a cumarina, observa-se que o tR do padrão preparado em etanol:água (1:2) é compatível com o tR nos extratos (Figura 17) e com o tR dos padrões quando adicionados ao extrato (Figura 18). Na amostra de *M. glomerata* a intensidade deste íon é muito baixa (Figura 17). Na figura 18, os

cromatogramas das mesmas amostras após a adição do padrão de cumarina mostram um aumento no pico da cumarina (tR 4,04 min).

Na Figura 19 observa-se que os espectros de massas (MS/MS) são iguais para todos estes picos cromatográficos, excetuando diferenças em intensidade devido a diferentes concentrações de cumarina encontradas, confirmando a identidade do composto. Portanto este método analítico é seletivo para a cumarina.

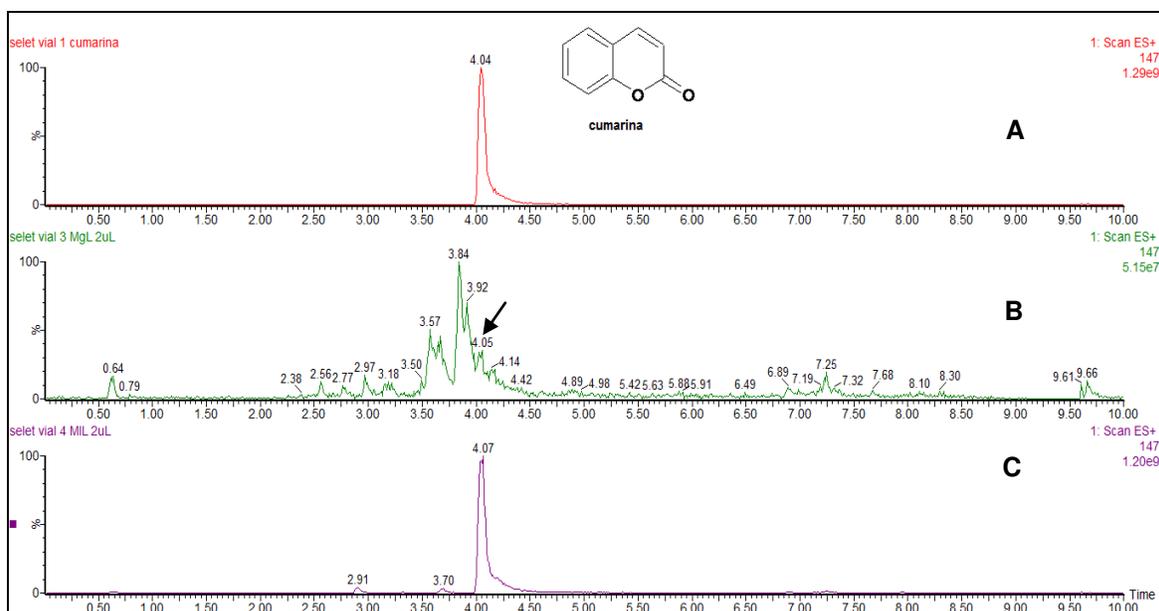


Figura 17: Comparação do tempo de retenção do padrão de cumarina preparado em solvente (A) com os extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C). Modo positivo (m/z 147).

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

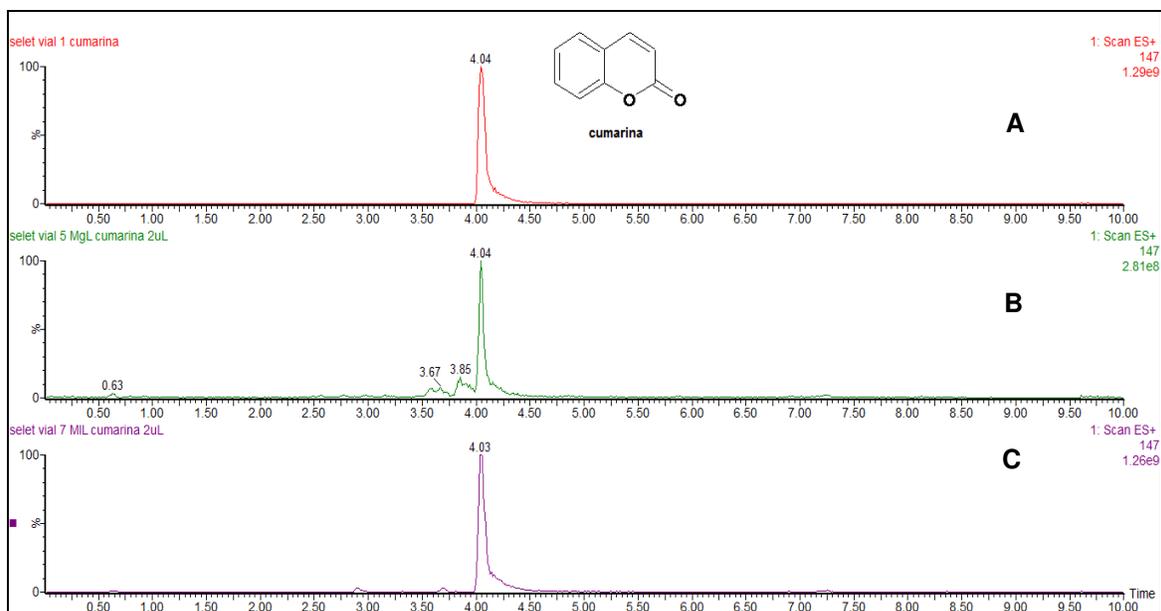


Figura 18: Comparação do tR do padrão de coumarina (A) após adição nos extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C). Modo positivo (m/z 147). Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

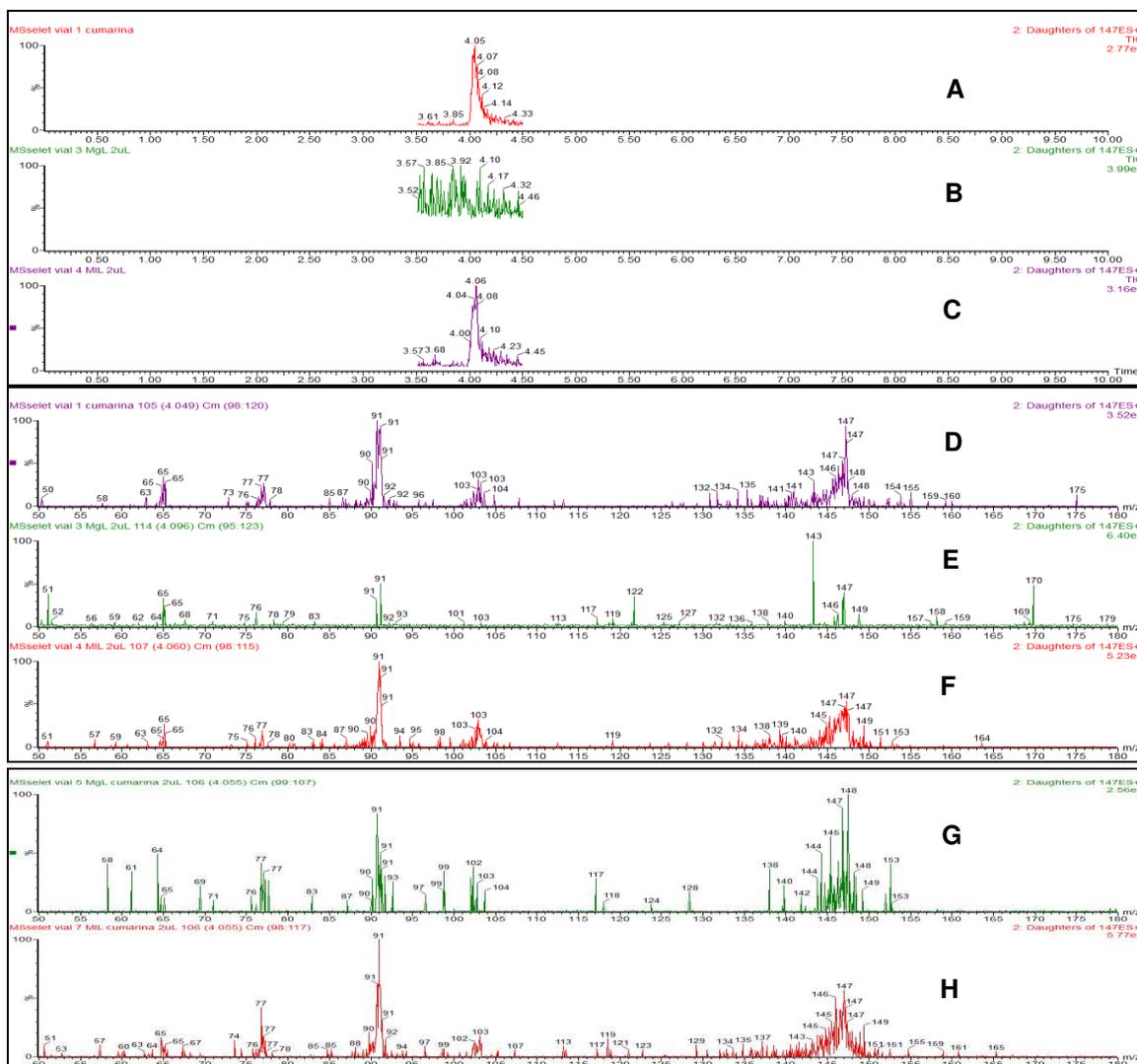


Figura 19: Comparação dos cromatogramas do padrão de cumarina com os extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*. MS do padrão de cumarina (A), MS dos extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C), MS/MS do padrão de cumarina (D), MS/MS dos extratos de *M. glomerata* (E) e *M. laevigata* (F), MS/MS do extrato de *M. glomerata* após adição do padrão de cumarina (G), MS/MS do extrato de *M. laevigata* após adição do padrão de cumarina (H). Modo positivo (m/z 147)
Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

Para o ácido clorogênico, verifica-se que o tR do padrão preparado em etanol:água (1:2) também é igual ao encontrado nos extratos (figura 20) e se mantém após a adição do padrão de ácido clorogênico nos extratos (figura 21). O espectro de massas do padrão também é igual aos espectros de massas obtidos destes picos nos cromatogramas dos extratos, antes e após a adição de padrão (figura 22), resguardadas as diferenças de intensidade devido às diferenças concentrações. Sendo assim, o método

analítico desenvolvido, é sensível para a análise do ácido clorogênico em extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

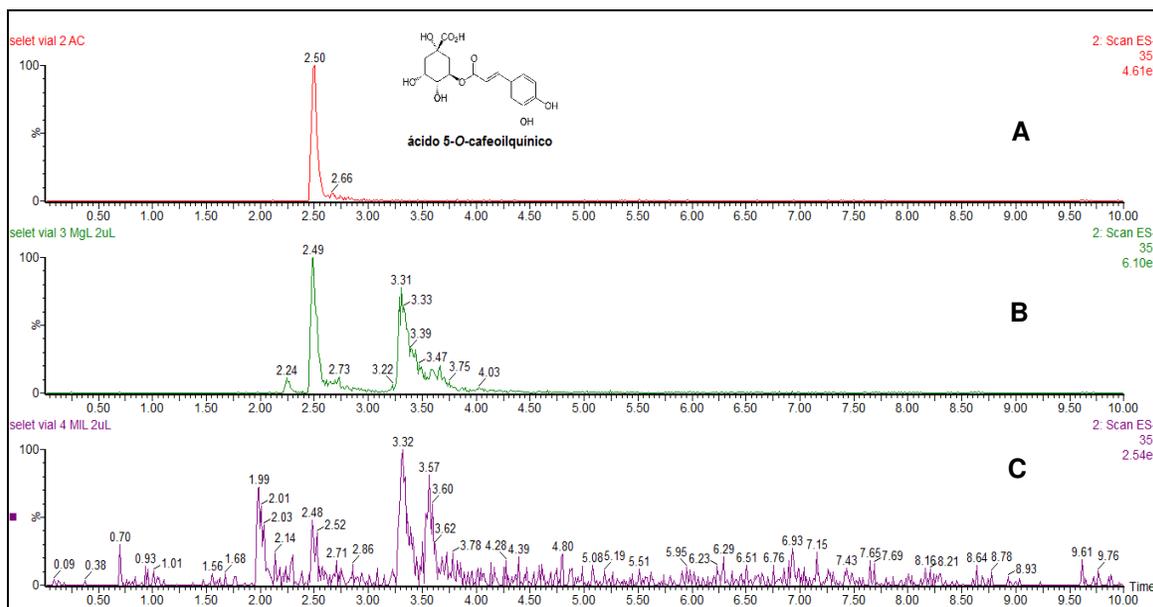


Figura 20: Comparação do tempo de retenção do padrão de ácido clorogênico (A) com os extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C). Modo negativo (m/z 353).

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

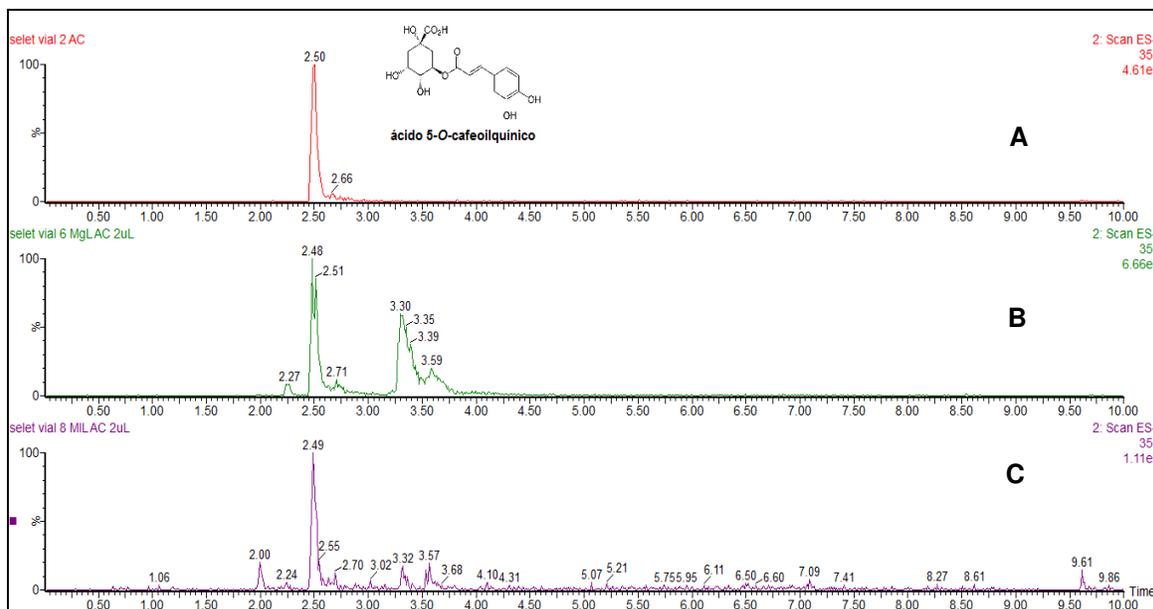


Figura 21: Comparação do tR do padrão de ácido clorogênico (m/z 353) (A) e dos extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C) após adição do padrão. Modo negativo (m/z 353).

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

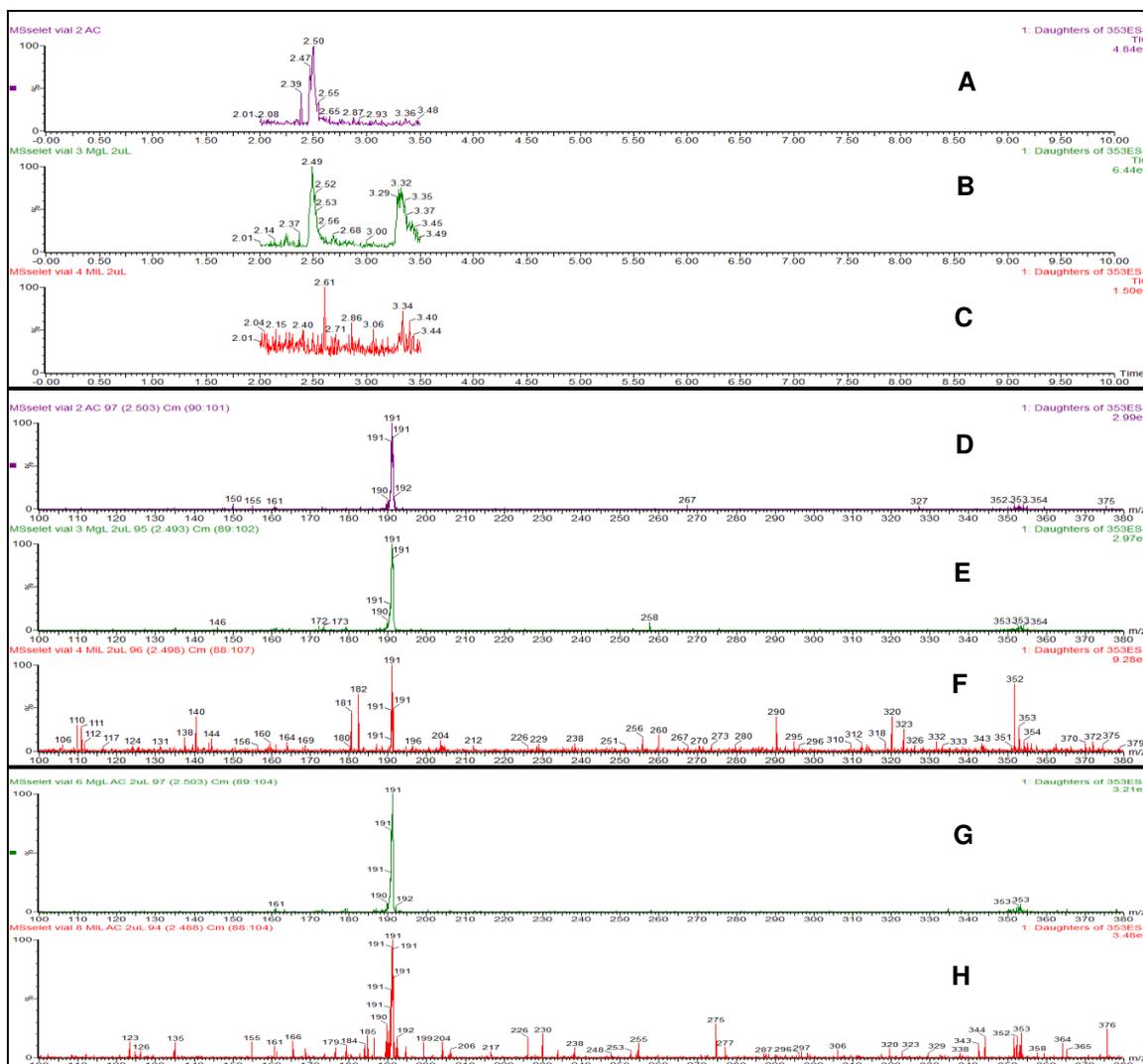


Figura 22: Comparação dos cromatogramas do padrão de ácido clorogênico com os extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*. MS do padrão de ácido clorogênico (A), MS dos extratos de *M. glomerata* (B) e *M. laevigata* (C), MS/MS do padrão de ácido clorogênico (D), MS/MS dos extratos de *M. glomerata* (E) e *M. laevigata* (F), MS/MS dos extratos de *M. glomerata* (G) e *M. laevigata* (H) após adição do padrão de ácido clorogênico. Modo negativo (m/z 353).

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

4.3.2 Efeito de matriz

Utilizando-se a equação descrita por Economou *et al.* (2009) avaliou-se o efeito da matriz sobre os analitos.

$$C\% = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s}\right)$$

Onde:

C% é a porcentagem de aumento ou supressão de sinal;

Sm é o coeficiente angular da curva analítica construída na matriz;

Ss é o coeficiente angular da curva analítica construída no solvente.

Tabela 10: Valores obtidos para avaliação do efeito de matriz.

Cumarina		Ácido clorogênico	
Sm	Ss	Sm	Ss
357107	342151	17798	14906
C%	-4,37	C%	-19,40

Observando os resultados expressos na tabela 10, conclui-se que ocorre uma supressão do sinal, provocada por interferentes da matriz, sendo uma supressão de 4,37 % para a cumarina e 19,40 % para o ácido clorogênico. Desta maneira, as curvas de calibração para estes analitos foram construídas utilizando um extrato de *M. glomerata* isenta destes marcadores (item 3.7.3).

4.3.3 Linearidade

A curva analítica foi obtida através da análise em triplicata de soluções de cumarina e ácido clorogênico, preparadas utilizando o extrato da amostra de *Mikania glomerata* obtida na cidade de Ubatuba – SP, isenta destes marcadores (Figura 23).

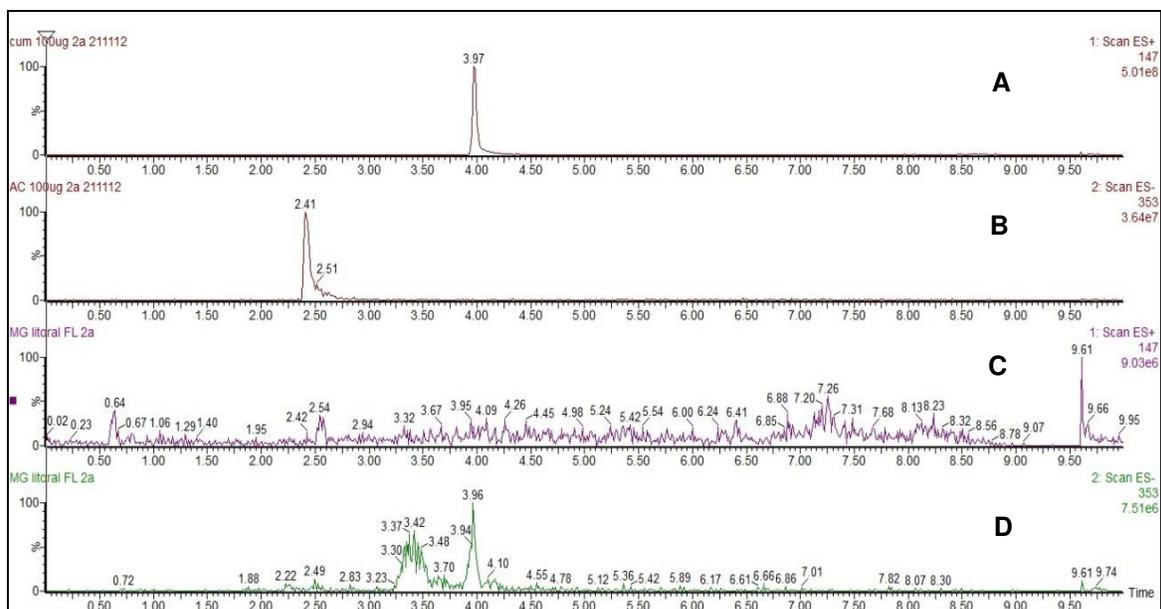


Figura 23: Cromatograma da amostra de *M. glomerata* obtida na cidade de Ubatuba - SP. Padrão de cumarina (A) em modo positivo (m/z 147), padrão de ácido clorogênico (B) em modo negativo (m/z 353), amostra de *M. glomerata* (C) modo positivo (m/z 147) e em modo negativo (D) (m/z 353).

Condições cromatográficas descritas no item 3.6.

Na curva de calibração da cumarina, obteve-se um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9718 e para o ácido clorogênico 0,9831. As curvas podem ser observadas nas Figuras 24 e 25.

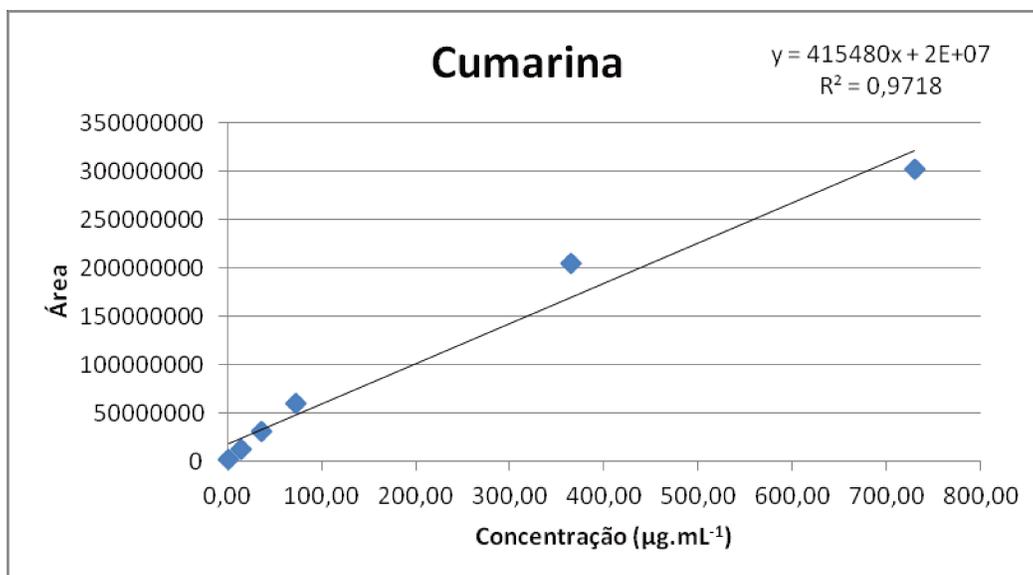


Figura 24: Curva analítica obtida pela análise de soluções de 1,46 µg.mL⁻¹ a 730 µg.mL⁻¹ de padrão de cumarina.

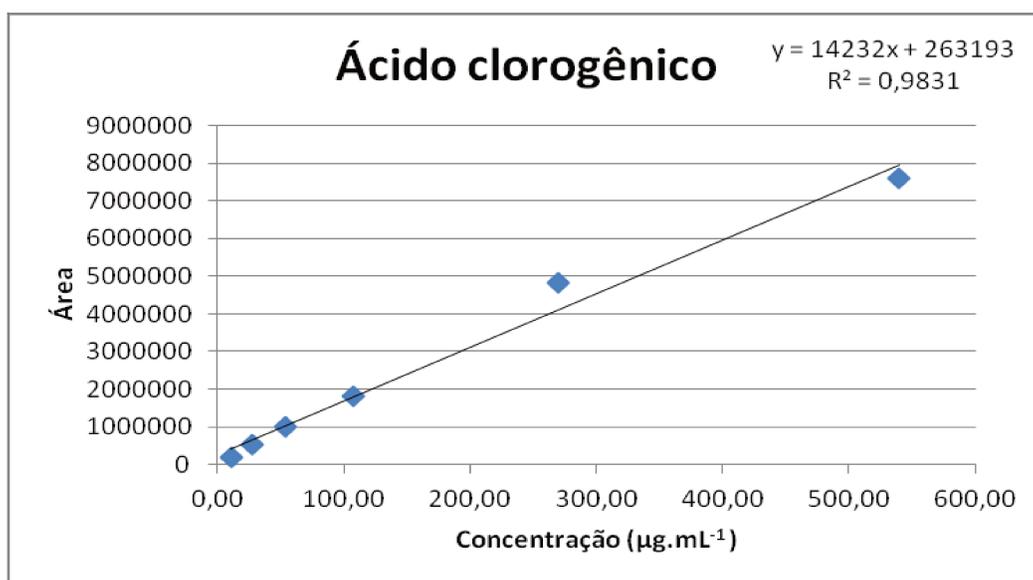


Figura 25: Curva analítica obtida pela análise de soluções de 10,80 µg.mL⁻¹ a 540 µg.mL⁻¹ de padrão de ácido clorogênico.

As curvas de calibração não apresentaram coeficiente de correlação de 0,99 conforme preconiza a RE nº 899 da ANVISA, possivelmente devido à interferência de componentes da matriz e a ampla faixa de concentração utilizada.

4.3.4 Limites de detecção e de quantificação

Para a cumarina foi obtido um limite de detecção de 0,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 3,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o ácido clorogênico, foi obtido um limite de detecção de 4,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 20,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.5 Precisão

A precisão intra-dia foi avaliada, utilizando cinco injeções diferentes dos extratos hidroalcoólicos de *M. laevigata* e *M. glomerata*, na proporção 1:2 em água deionizada. Os valores de área dos picos de cumarina (m/z 147 – modo positivo) e de ácido clorogênico (m/z 353 – modo negativo) foram acompanhados. Os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Valores de área para cumarina e ácido clorogênico para precisão da amostra de *M. glomerata*.

<i>Mikania glomerata</i>			
Área de cumarina		Área do ácido clorogênico	
	887419		3726890
	936638		3519436
	895622		3832699
	990733		3804467
	897874		3837630
média	921657	média	3744224
desvio padrão	43045	desvio padrão	133240
CV (%)	5	CV (%)	4

Tabela 12: Valores de área para cumarina e ácido clorogênico para precisão da amostra de *M. laevigata*.

<i>Mikania laevigata</i>			
Área de cumarina		Área do ácido clorogênico	
108198240		207780	
107282192		216860	
109518144		225617	
108107920		221602	
110203032		204000	
média	108661906	média	215172
desvio padrão	1176192	desvio padrão	9121
CV (%)	1	CV (%)	4

Através do coeficiente de variação (CV) pode-se concluir que o método analítico desenvolvido é preciso para os analitos utilizados, pois seus valores de CV foram iguais ou inferiores a 5 %, conforme preconizado pela Resolução RE nº 899 da ANVISA.

4.3.6 Exatidão

Através da recuperação (R) foi calculada a exatidão do método, adicionando-se as concentrações de 30, 150 e 400 µg.mL⁻¹ de cumarina e 30, 100 e 400 µg.mL⁻¹ de ácido clorogênico em triplicata, no extrato preparado das duas espécies de *Mikania*. Utilizando-se a equação a seguir, obtiveram-se os resultados expressos na Tabela 13, O método pode ser considerado exato, pois os valores de recuperação ficaram dentro da faixa de 70 a 120 % [60].

$$R (\%) = (C1 - C2) / C3 \times 100$$

Onde:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada.

C2 = concentração determinada na amostra nãofortificada.

C3 = concentração de fortificação.

Tabela 13: Recuperação para as amostras de *Mikania*.

Extrato/Padrão	<i>Mikania laevigata</i> /cumarina			<i>Mikania glomerata</i> /ácido clorogênico		
	30	150	400	30	100	400
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	30	150	400	30	100	400
Recuperação (%)	75,13	84,6	67,04	106,42	88,56	95,74

Após os ensaios realizados, pode-se concluir que o método foi validado. Este método foi aplicado na análise dos extratos submetidos ao estudo de estabilidade, às amostras comerciais e às amostras cultivadas em diferentes localidades.

4.4 Estudo de estabilidade

Os quatro extratos de *Mikania* preparados neste trabalho (*M. laevigata* – folhas secas em estufa e em liofilizador; *M. glomerata* – folhas secas em estufa e liofilizador) foram submetidos ao estudo de estabilidade de acordo com as especificações descritas no item 3.8. Além destes extratos, amostras comerciais obtidas através de distribuidora de matéria-prima (Tintura de guaco e Extrato fluido de guaco) também foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerado, conforme mostra a Tabela 14. As amostras comerciais foram obtidas por envio de amostra grátis pela distribuidora contatada, acondicionadas em frascos plásticos com tampa rosca e mantidas em geladeira até o uso.

Os teores de cumarina e ácido clorogênico foram acompanhados durante o estudo de estabilidade e os resultados obtidos estão expressos nas Tabelas de 15 a 24. Nas figuras 26 a 30 estão ilustrados os gráficos construídos para avaliação estatística dos resultados obtidos.

Tabela 14: Condições do estudo de estabilidade desenvolvido.

Amostra	Tipo de Estudo	Temperatura de armazenamento / período do estudo
Extrato preparado com folhas de <i>M. laevigata</i> secas em estufa (MIE)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses
	estudo de longa duração	30 °C / 12 meses
	temperatura ambiente sem luz	22 °C / 12 meses
	temperatura ambiente com luz	22 °C / 12 meses
Extrato preparado com folhas de <i>M. laevigata</i> secas em liofilizador (MIL)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses
	estudo de longa duração	30 °C / 12 meses
	temperatura ambiente sem luz	22 °C / 12 meses
	temperatura ambiente com luz	22 °C / 12 meses
Extrato preparado com folhas de <i>M. glomerata</i> secas em estufa (MgE)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses
	estudo de longa duração	30 °C / 12 meses
	temperatura ambiente sem luz	22 °C / 12 meses
	temperatura ambiente com luz	22 °C / 12 meses
Extrato preparado com folhas de <i>M. glomerata</i> secas em liofilizador (MgL)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses
	estudo de longa duração	30 °C / 12 meses
	temperatura ambiente sem luz	22 °C / 12 meses
	temperatura ambiente com luz	22 °C / 12 meses
Amostra comercial de tintura de guaco (TG)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses
Amostra comercial de extrato fluido de guaco (EFG)	estudo acelerado	40 °C / 6 meses

Tabela 15: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo de estabilidade de longa duração.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	*	-	*	-	*	-	*	-
MgL	*	-	*	-	*	-	*	-
MIE	775,11	3,26	784,00	0,49	504,92	1,70	290,91	2,79
MIL	1131,74	0,61	917,80	1,33	670,44	3,28	365,35	1,86

Tabela 16: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo de estabilidade acelerado.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	*	-	*	-	*	-
MgL	*	-	*	-	*	-
MIE	775,11	3,26	631,06	1,40	504,91	1,20
MIL	1131,74	0,61	752,54	0,58	611,61	2,85

Tabela 17: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo a temperatura ambiente com incidência de luz.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	*	-	*	-	*	-	*	-
MgL	*	-	*	-	*	-	*	-
MIE	775,11	3,26	606,18	1,15	459,55	10,13	295,26	3,95
MIL	1131,74	0,61	732,12	0,11	612,04	0,61	397,43	1,06

Tabela 18: Teor de cumarina nas amostras durante o estudo a temperatura ambiente sem incidência de luz.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	*	-	*	-	*	-	*	-
MgL	*	-	*	-	*	-	*	-
MIE	775,11	3,26	571,27	0,56	438,45	1,93	290,86	0,26
MIL	1131,74	0,61	695,12	0,10	550,41	1,54	343,42	2,40

Legenda: MgE: *M. glomerata* seca em estufa; MgL: *M. glomerata* seca em liofilizador; MIE: *M. laevigata* seca em estufa; MIL: *M. laevigata* seca em liofilizador. * valores abaixo do limite de quantificação.

Tabela 19: Teor de ácido clorogênico nas amostras durante o estudo de estabilidade de longa duração.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	1348,02	19,94	1396,45	1,53	779,80	5,20	510,46	5,95
MgL	1934,03	5,79	1704,12	3,01	1006,38	5,42	577,83	1,91
MIE	*	-	*	-	*	-	*	-
MIL	*	-	*	-	*	-	*	-

Tabela 20: Teor de ácido clorogênico nas amostras durante o estudo de estabilidade acelerado.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	1348,02	19,94	1384,75	1,29	868,25	11,10
MgL	1934,03	5,79	1853,75	2,64	958,14	9,02
MIE	*	-	*	-	*	-
MIL	*	-	*	-	*	-

Tabela 21: Teor de ácido clorogênico nas amostras o estudo a temperatura ambiente com incidência de luz.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	1348,02	19,94	1373,74	1,67	727,20	0,80	467,58	0,09
MgL	1934,03	5,79	1608,58	1,39	948,01	4,70	522,00	11,97
MIE	*	-	*	-	*	-	*	-
MIL	*	-	*	-	*	-	*	-

Tabela 22: Teor de ácido clorogênico nas amostras o estudo a temperatura ambiente sem incidência de luz.

Amostra	Teor inicial (µg/mL)	CV (%)	Teor após 3 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 6 meses (µg/mL)	CV (%)	Teor após 12 meses (µg/mL)	CV (%)
MgE	1348,02	19,94	1322,65	5,49	739,66	1,63	496,25	3,89
MgL	1934,03	5,79	1562,93	1,98	834,96	0,11	595,96	1,39
MIE	*	-	*	-	*	-	*	-
MIL	*	-	*	-	*	-	*	-

Legenda: MgE: *M. glomerata* seca em estufa; MgL: *M. glomerata* seca em liofilizador; MIE: *M. laevigata* seca em estufa; MIL: *M. laevigata* seca em liofilizador. * valores abaixo do limite de quantificação.

Tabela 23: Teor de cumarina durante o estudo de estabilidade acelerado para as amostras comerciais.

Amostra	Teor inicial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Teor após 3 meses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Teor após 6 meses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)
EFG	358,23	23,11	573,17	0,80	125,81	4,35
TG	232,33	23,53	373,19	0,89	199,33	2,67

Legenda: EFG: Extrato Fluido de Guaco; TG: Tintura de Guaco.

Tabela 24: Teor de ácido clorogênico durante o estudo de estabilidade acelerado para as amostras comerciais.

Amostra	Teor inicial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Teor após 3 meses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Teor após 6 meses ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)
EFG	159,05	21,20	242,61	3,61	129,67	3,12
TG	143,75	12,28	162,42	2,70	84,99	5,61

Legenda: EFG: Extrato Fluido de Guaco; TG: Tintura de Guaco.

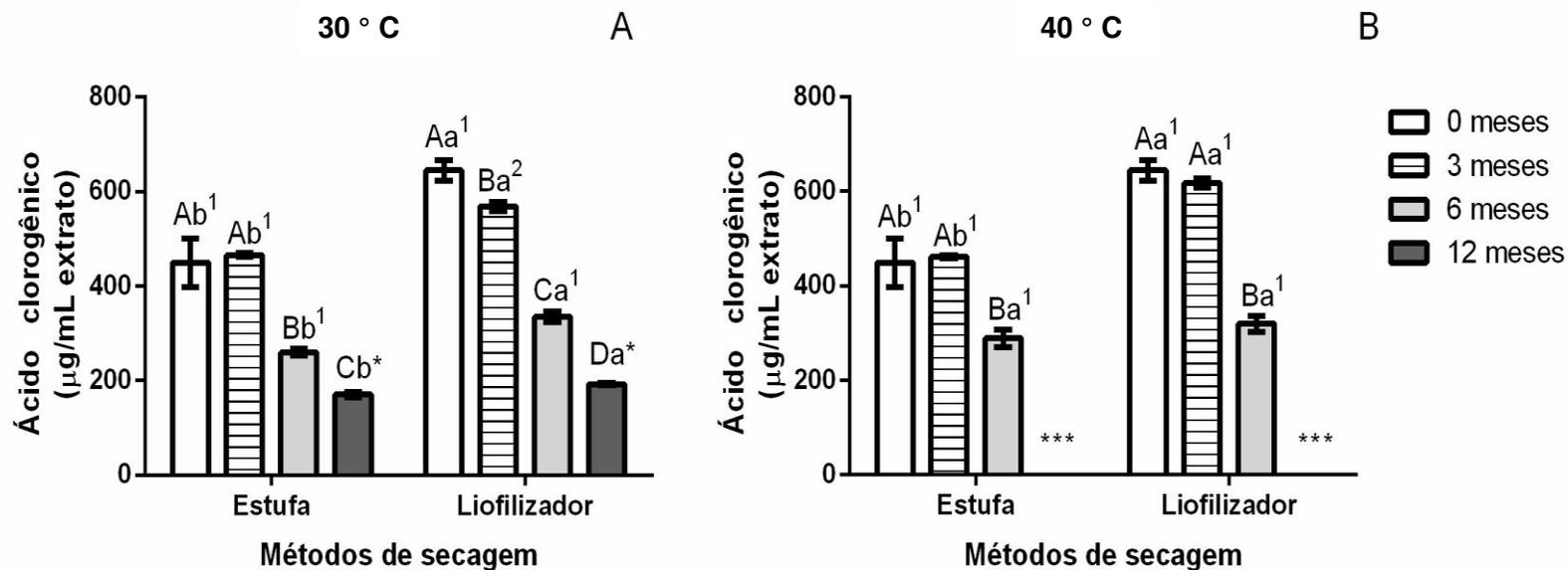


Figura 26: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de *Mikania glomerata*. Variação do teor de ácido clorogênico em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.

Legenda: Em (A) Estudo de estabilidade de longa duração a 30 °C e (B) Estudo de estabilidade acelerado a 40 °C. (*) indica que não houve dados coletados para este grupo; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo dentro de um mesmo método de secagem (0, 3, 6 e 12 meses); letras minúsculas indicam diferenças entre os métodos de secagem para um mesmo tempo do estudo de estabilidade (estufa e liofilizador); numerais indicam diferenças entre temperaturas de armazenamento (30 °C e 40 °C). Experimento realizado em triplicata. Barras de erro: erro padrão.

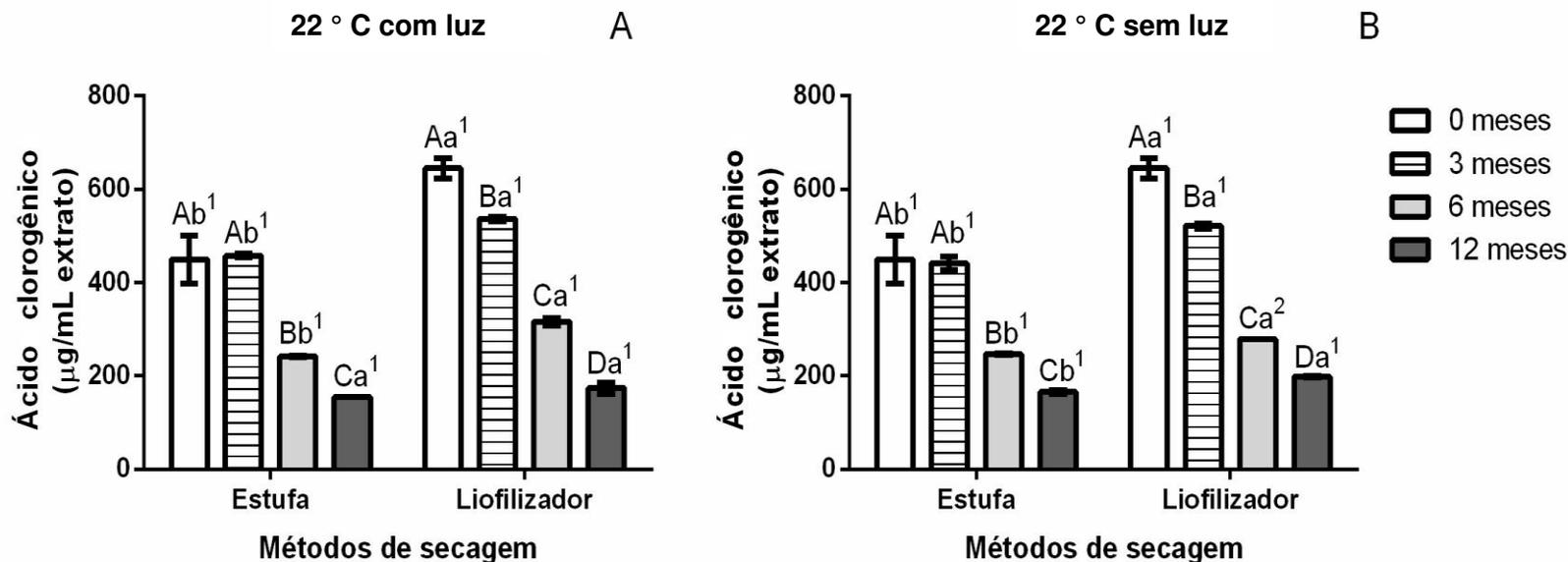


Figura 27: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de *Mikania glomerata*. Variação do teor de ácido clorogênico em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.

Legenda: Em (A) Estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C com luz e (B) Estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C sem luz. (*) indica que não houve dados coletados para este grupo; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo dentro de um mesmo método de secagem (0, 3, 6 e 12 meses); letras minúsculas indicam diferenças entre os métodos de secagem para um mesmo tempo do estudo de estabilidade (estufa e liofilizador); numerais indicam diferenças entre incidência de luz (com e sem luz). Experimento realizado em triplicata. Barras de erro: erro padrão.

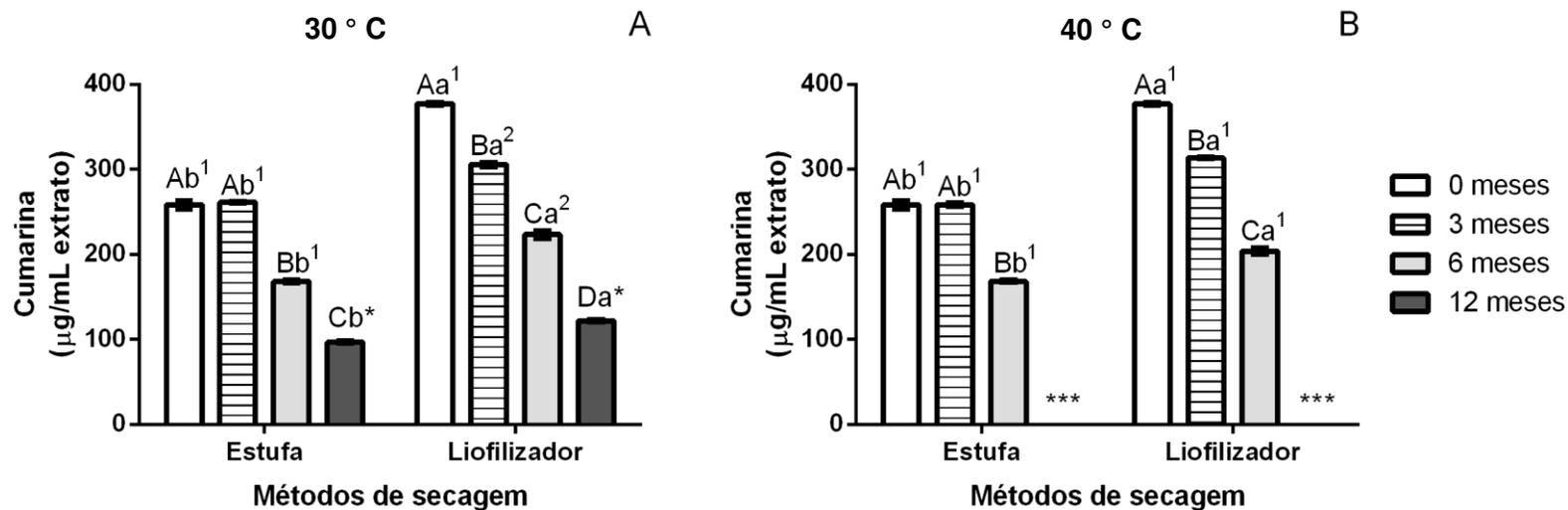


Figura 28: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata*. Variação do teor de cumarina em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.

Legenda: Em (A) Estudo de estabilidade de longa duração a 30 °C e (B) Estudo de estabilidade acelerado a 40 °C. (*) indica que não houve dados coletados para este grupo; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo dentro de um mesmo método de secagem (0, 3, 6 e 12 meses); letras minúsculas indicam diferenças entre os métodos de secagem para um mesmo tempo do estudo de estabilidade (estufa e liofilizador); numerais indicam diferenças entre temperaturas de armazenamento (30 °C e 40 °C). Experimento realizado em triplicata. Barras de erro: erro padrão.

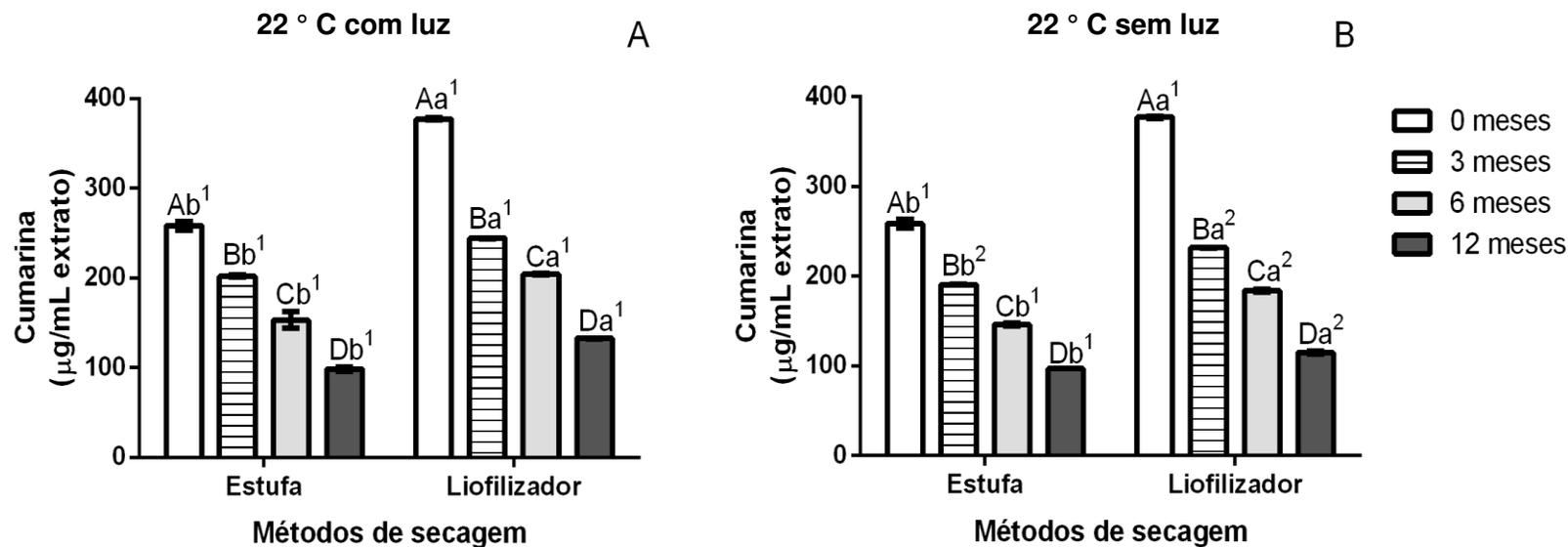


Figura 29: Avaliação da estabilidade dos extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata*. Variação do teor de cumarina em extratos de folhas submetidas a dois métodos de secagem, em estufa e em liofilizador.

Legenda: Em (A) Estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C com luz e (B) Estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C sem luz. (*) indica que não houve dados coletados para este grupo; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo dentro de um mesmo método de secagem (0, 3, 6, 12 meses); letras minúsculas indicam diferenças entre os métodos de secagem para um mesmo tempo de estudo de estabilidade (estufa e liofilizador); numerais indicam diferenças entre incidência de luz (com e sem luz). Experimento realizado em triplicata. Barras de erro: erro padrão.

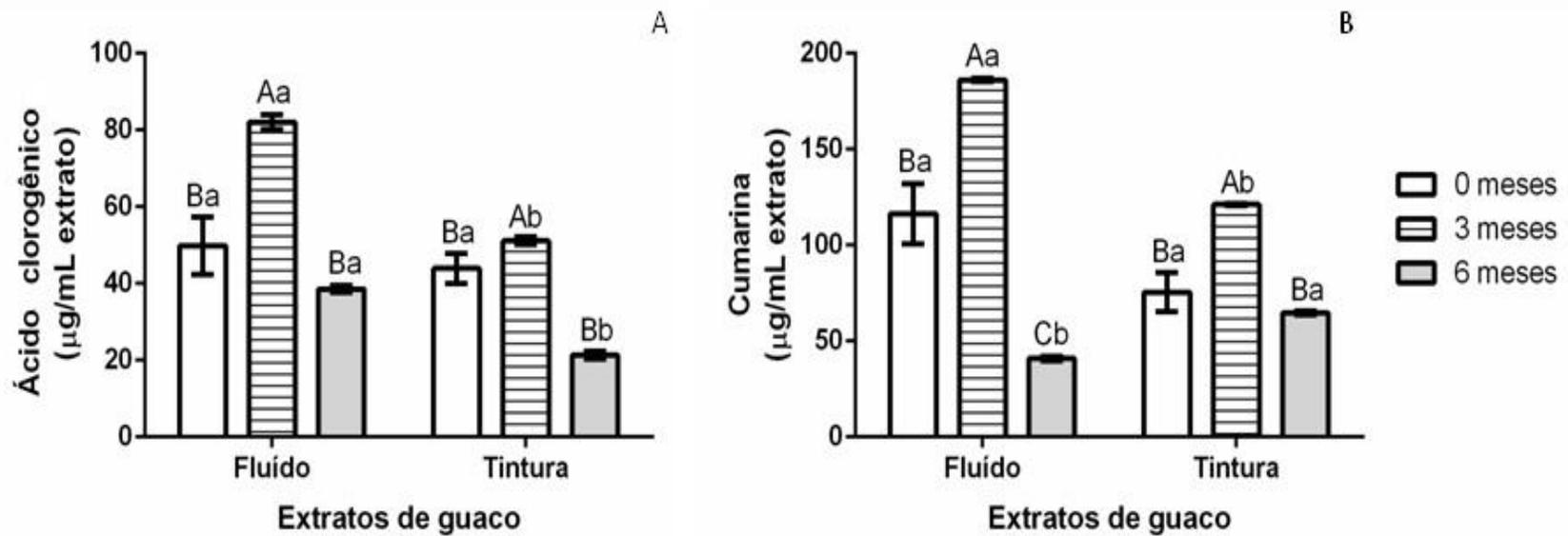


Figura 30: Avaliação da estabilidade de extratos comerciais de guaco (Extrato Fluido e Tintura de guaco) submetidos ao estudo de estabilidade acelerado (40 °C).

Legenda: Quantificação de (A) ácido clorogênico e (B) cumarina. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo dentro de um mesmo tipo de extrato; letras minúsculas indicam diferenças entre os tipos de extratos para um mesmo tempo de análise. Experimento realizado em triplicata. Barras de erro: erro padrão.

Para as amostras de *M. glomerata*, foram avaliados os teores de ácido clorogênico, conforme ilustram as figuras 26 e 27.

Na figura 26 é apresentado o gráfico que ilustra a variação deste composto nos estudos de estabilidade de longa duração (12 meses - 30 °C) e acelerado (6 meses - 40 °C).

Inicialmente, observa-se que o processo de secagem das folhas de *M. glomerata*, em estufa e em liofilizador, influencia significativamente ($P = 0,05 \%$) no teor de ácido clorogênico (tempo 0 meses), observando-se maior teor para as folhas que foram liofilizadas.

Para o estudo de estabilidade de longa duração (30 °C), observa-se que a diferença do teor de ácido clorogênico não é significativamente diferente nos 3 primeiros meses do estudo, para as amostras secas em estufa. Sendo significativamente diferente somente após este período. O mesmo ocorre para o estudo de estabilidade acelerado (40 °C).

Para as amostras secas em liofilizador, no estudo de estabilidade de longa duração, já ocorre uma diferença significativa no teor de ácido clorogênico, nos 3 primeiros meses. O mesmo não ocorre para o estudo de estabilidade acelerado.

Comparando-se os estudos de estabilidade de longa duração e acelerado, observa-se que em 3 meses, as amostras secas em estufa não apresentaram diferença significativa no teor de ácido clorogênico. Já as amostras secas em liofilizador apresentaram diferença significativa. Em 6 meses não houve diferença significativa nos dois estudos.

No tempo de 12 meses é possível comparar somente o estudo de estabilidade de longa duração, sendo assim, observa-se que para esta análise, o teor de ácido clorogênico é significativamente diferente entre as amostras submetidas a secagem em estufa e em liofilizador.

Na figura 27 é apresentado o gráfico que ilustra a variação do teor de ácido clorogênico no estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C com incidência de luz e sem incidência de luz.

Para o estudo de estabilidade de longa duração (22 °C) com luz, observa-se que a diferença do teor de ácido clorogênico não é significativamente ($P = 0,05 \%$) diferente nos 3 primeiros meses do estudo, para as amostras secas em estufa. Sendo significativamente diferente somente após este período. O mesmo ocorre para o estudo de estabilidade de longa duração (22 °C) sem luz.

Para as amostras secas em liofilizador, tanto no estudo de estabilidade de longa duração (22 °C) com luz como no estudo sem luz, já ocorre uma diferença significativa no teor de ácido clorogênico, nos 3 primeiros meses.

Comparando-se os estudos de estabilidade de longa duração a 22 °C com luz e sem luz, observa-se que em 3 meses, as amostras secas em estufa e em liofilizador não apresentaram diferença significativa no teor de ácido clorogênico. Em 6 meses não houve diferença significativa para as amostras secas em estufa, porém houve diferença significativa para as amostras liofilizadas. Em 12 meses não houve diferença significativa entre os estudos para ambos os processos de secagem das folhas.

Para as amostras de *M. laevigata*, foram avaliados os teores de cumarina, conforme ilustram as figuras 28 e 29.

Na figura 28 é apresentado o gráfico que ilustra a variação deste composto nos estudos de estabilidade de longa duração (30 °C) e acelerado (40 °C).

Inicialmente, observa-se que o processo de secagem das folhas de *M. laevigata*, em estufa e em liofilizador, influencia significativamente ($P = 0,05 \%$) no teor de cumarina (tempo 0 meses), observando-se maior teor para as folhas que foram liofilizadas.

Para o estudo de estabilidade de longa duração (30 °C), observa-se que a diferença do teor de cumarina não é significativamente diferente nos 3 primeiros meses do estudo, para as amostras secas em estufa. Sendo significativamente diferente somente após este período. O mesmo ocorre para o estudo de estabilidade acelerado (40 °C).

Para as amostras secas em liofilizador, no estudo de estabilidade de longa duração, já ocorre uma diferença significativa no teor de cumarina, nos 3 primeiros meses. O mesmo ocorre para o estudo de estabilidade acelerado.

Comparando-se os estudos de estabilidade de longa duração e acelerado, observa-se que em 3 meses, as amostras secas em estufa não apresentaram diferença significativa no teor de cumarina. Já as amostras secas em liofilizador apresentaram diferença significativa. Em 6 meses houve diferença significativa somente para as amostras secas em liofilizador.

No tempo de 12 meses é possível comparar somente o estudo de estabilidade de longa duração, sendo assim, observa-se que para esta dosagem, o teor de cumarina é significativamente diferente entre as amostras submetidas a secagem em estufa e em liofilizador.

Na figura 29 é apresentado o gráfico que ilustra a variação do teor de cumarina durante o estudo de estabilidade de longa duração a 22 °C com incidência de luz e sem incidência de luz.

Para o estudo de estabilidade de longa duração (22 °C) com luz, observa-se que o teor de cumarina é significativamente ($P = 0,05 \%$) diferente em todos os meses do estudo (0, 3, 6 e 12 meses) para as amostras secas em estufa. O mesmo ocorre para o estudo de estabilidade de longa duração (22 °C) sem luz. Este mesmo perfil é observado para as amostras secas em liofilizador.

Comparando-se os estudos de estabilidade de longa duração a 22 °C com luz e sem luz, observa-se que em 3 meses as amostras secas em estufa e em liofilizador apresentaram diferença significativa no teor de cumarina. Em 6 meses não houve diferença significativa para as amostras secas em estufa, porém houve diferença significativa para as amostras liofilizadas. Em 12 meses o mesmo perfil é observado.

Na figura 30 é apresentado o gráfico que ilustra a variação do teor de ácido clorogênico e cumarina em amostras comerciais de extrato fluido de guaco e tintura de guaco, submetidos ao estudo de estabilidade acelerado (40 °C).

Com relação ao ácido clorogênico, o teor inicial (0 meses) deste composto não é significativamente ($P = 0,05 \%$) diferente entre as amostras (extrato fluido de guaco e tintura de guaco).

Para o extrato fluido, a diferença no teor é significativamente diferente entre os tempos avaliados (0, 3 e 6 meses). O mesmo ocorre para a tintura. Comparando extrato

fluido e tintura, no decorrer do estudo, em 3 e 6 meses, a diferença do teor de ácido clorogênico é significativamente diferente entre as amostras.

Com relação à cumarina, o teor inicial (0 meses) deste composto não é significativamente diferente entre as amostras (extrato fluido de guaco e tintura de guaco).

Para o extrato fluido, a diferença no teor é significativamente diferente entre os tempos avaliados (0, 3 e 6 meses). O mesmo ocorre para a tintura. Comparando extrato fluido e tintura, no decorrer do estudo, em 3 e 6 meses, a diferença do teor de cumarina é significativamente diferente entre as amostras.

De acordo com Amaral (2009), a diminuição ou aumento do teor de cumarina indicam perda por volatilização e equilíbrio dos isômeros *cis-trans*, respectivamente, em função da temperatura, que pode promover a abertura do anel cumárico com o tempo de armazenamento. Com o aumento da temperatura ocorre uma ciclização do precursor (isômero *trans*) em cumarina, provocando seu aumento [37]. O armazenamento dos extratos no solvente de extração também pode favorecer a degradação dos compostos.

Na Tabela 25 estão apresentadas as porcentagens de redução do teor de cumarina para os estudos de estabilidade realizados, e na Tabela 26 os valores para o ácido clorogênico.

Tabela 25: Porcentagem de redução do teor de cumarina para os extratos avaliados.

Amostra	% de redução após 3 meses	% de redução após 6 meses	% de redução após 12 meses
Estudo de estabilidade de longa duração			
MLE	+ 1,15	34,86	62,47
MLL	18,9	40,76	67,72
Estudo de estabilidade acelerado			
EF	+ 60,00	64,88	-
TG	+ 60,63	14,20	-
MLE	18,58	34,86	-
MLL	33,51	45,96	-
Estudo de estabilidade a temperatura ambiente com luz			
MLE	21,79	40,71	61,91
MLL	35,31	45,92	64,88
Estudo de estabilidade a temperatura ambiente sem luz			
MLE	26,30	43,43	62,48
MLL	38,58	51,37	69,66

Legenda: MLE: *M. laevigata* seca em estufa; MLL: *M. laevigata* seca em liofilizador; EFG: extrato fluido de guaco; TG: tintura de guaco; símbolo + : aumento na % de teor.

Tabela 26: Porcentagem de redução do teor de ácido clorogênico para os extratos avaliados.

Amostra	% de redução após 3 meses	% de redução após 6 meses	% de redução após 12 meses
Estudo de estabilidade de longa duração			
MGE	+ 3,59	42,15	62,13
MGL	11,89	47,96	70,12
Estudo de estabilidade acelerado			
EF	+ 52,54	18,47	-
TG	+ 13,00	40,88	-
MGE	+ 2,72	35,59	-
MGL	4,15	50,46	-
Estudo de estabilidade a temperatura ambiente com luz			
MGE	+ 1,91	46,05	65,31
MGL	16,83	50,98	73,01
Estudo de estabilidade a temperatura ambiente sem luz			
MGE	1,88	45,13	63,19
MGL	19,19	56,83	69,19

Legenda: MGE: *M. glomerata* seca em estufa; MGL: *M. glomerata* seca em liofilizador; EFG: extrato fluido de guaco; TG: tintura de guaco; + aumento na % de teor.

De acordo com a RESOLUÇÃO - RE nº 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA, o prazo de validade provisório de 24 meses, somente é aprovado se o estudo de estabilidade acelerado ou de longa duração apresentar variação menor ou igual a 5,0% do valor de análise da liberação do lote. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1% e 10,0% no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório será reduzido à metade, ou seja, será de 12 meses.

Para os extratos avaliados, o teor de cumarina no estudo de estabilidade de longa duração e no estudo de estabilidade acelerado, tiveram uma redução muito superior aos 5,0 % permitidos pela ANVISA, para prazo de validade de 24 meses, e também, superiores aos 10,0 % para prazo de validade de 12 meses. Pode-se observar também que a temperatura de armazenamento e a incidência ou não de luz, não interferem na manutenção do teor de cumarina nos extratos de *Mikania*, já que os estudos a temperatura ambiente, com e sem incidência de luz, mostraram uma grande redução no teor de cumarina nos extratos. O mesmo comportamento pode ser observado para o teor do ácido clorogênico.

Desta maneira, os prazos de validade destes extratos deveriam ser de menos que 3 meses. Embora o extrato fluido e tintura de guaco, comerciais, testados tinham no rótulo prazos de 2 anos, os resultados deste estudo de estabilidade não dá aval a estes prazos.

4.5 Amostras comerciais e amostras cultivadas em diferentes regiões

Foram obtidas diversas amostras comerciais de drogas vegetais e tintura de guaco. Avaliaram-se os teores de cumarina e de ácido clorogênico nestas amostras, conforme descrito no item 3.6, a fim de verificar se o teor destes compostos se assemelhava as amostras utilizadas no estudo de estabilidade. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 27.

Tabela 27: Teor de cumarina e de ácido clorogênico em amostras comerciais de diferentes localidades.

Identificação da amostra	Apresentação	Obtenção	Teor de cumarina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Teor de ácido clorogênico ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1 - Guaco	Droga vegetal	Mercado Municipal de Porto Alegre – RS	4,04	4,54
2 - Guaco – <i>Mikania</i>	Droga vegetal	Mercado Municipal de Porto Alegre – RS	155,70	41,67
3 - Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Loja de produtos naturais em Florianópolis – SC	170,50	64,76
4 - Guaco	Droga vegetal	Manaus - AM	128,20	156,63
5 - <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia Viva – Brasília – DF	375,39	29,69
6 - Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	254,22	-
7 - Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	316,72	-
8 - Guaco – <i>Mikania glomerata</i>	Droga vegetal	Farmácia de manipulação – Paulínia – SP	2794,76	14,27
9 - Tintura de guaco	Tintura	Farmácia de Manipulação – Atibaia – SP	36,60	11,28

Com exceção das amostras 1 e 4, as demais amostras comerciais obtidas apresentaram teor de cumarina e de ácido clorogênico semelhantes aos das amostras de *M. laevigata* utilizadas no estudo de estabilidade: maior quantidade de cumarina quanto comparada à quantidade de ácido clorogênico. A amostra 4 apresentou teores semelhantes de cumarina e de ácido clorogênico, ambos inferiores as demais amostras analisadas. Esse comportamento possivelmente foi observado devido ao estado desta amostra, que encontrava-se com aspecto envelhecido e com odor de bolor, o que pode ter causado a degradação destes compostos.

Com isso pode-se concluir que as amostras comerciais estão sendo erroneamente identificadas, provavelmente devido a sua semelhança morfoanatômica, apresentadas a população como *Mikania glomerata*, porém apresentam teores de cumarina e de ácido clorogênico semelhantes ao da *Mikania laevigata*.

As amostras de plantas frescas *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas em diferentes localidades também tiveram seu teor de cumarina e de ácido clorogênico avaliados. Os resultados estão expressos na Tabela 28.

As amostras de *M. glomerata* e *M. laevigata* obtidas no CPQBA – Unicamp apresentaram o mesmo perfil das amostras utilizadas no estudo de estabilidade e as amostras 8, 9 e 10 apresentaram o perfil semelhante às amostras de *M. laevigata*, maior quantidade de cumarina em comparação a quantidade de ácido clorogênico.

Tabela 28: Teor de cumarina e de ácido clorogênico em amostras cultivadas em diferentes localidades.

Amostra	Obtenção	Local de produção	Teor de cumarina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Teor de ácido clorogênico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1 - <i>M. glomerata</i> - Clone 1	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	529,20
2 - <i>M. glomerata</i> - Clone 2	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	570,93
3 - <i>M. glomerata</i> - Clone 3	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	616,60
4 - <i>M. glomerata</i> - 1	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	211,3
5 - <i>M. glomerata</i> – 2	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	786,00
6 - <i>M. glomerata</i> – 3	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	-	260,70
7 - <i>M. laevigata</i> - 1	Campo experimental do CPQBA – Unicamp	Paulínia – SP	1024,89	6,49
8 - Guaco	Muda residencial	Guarapuava – PR	172,91	51,56
9 - Guaco	Muda residencial	João Pessoa – PB	365,02	6,07
10 - Guaco	Muda residencial	São Paulo – SP	354,99	-

5 Conclusão

O presente trabalho realizou um estudo de estabilidade com extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, conforme preconiza a RE nº 1 de 29 de julho de 2005 da ANVISA, acompanhando por UHPLC-MS, a variação do teor de cumarina e de ácido clorogênico, a fim de se verificar o prazo de estabilidade estabelecido para produtos fitoterápicos. Comparou-se o teor do marcador químico desta espécie, a cumarina, por UHPLC-MS, em diferentes amostras comerciais e amostras cultivadas em diferentes localidades de Brasil.

Pontualmente, por meio desta dissertação, conclui-se que:

- ✓ A forma de secagem das folhas das duas espécies estudadas, em estufa e em liofilizador, influenciou significativamente no teor de cumarina e de ácido clorogênico, sendo encontrado maior teor destes dois compostos nas amostras liofilizadas;
- ✓ O perfil químico das espécies mostrou um maior teor de cumarina na *Mikania laevigata* e menor na *Mikania glomerata*. Com relação ao ácido clorogênico, o oposto foi observado, a *Mikania glomerata* apresenta maior teor deste composto em relação à *Mikania laevigata*;
- ✓ O método analítico desenvolvido por UHPLC-MS foi validado e as figuras de mérito foram atendidas;
- ✓ Em relação ao estudo de estabilidade, foi observado que ocorre a degradação dos analitos avaliados, cumarina e ácido clorogênico, ao longo do tempo para ambas as espécies.
- ✓ A presença ou não de luminosidade e temperatura mais branda ou mais drástica não influenciam na preservação do teor desses analitos. As amostras submetidas ao estudo de estabilidade a temperatura ambiente e sem luz, condições que favorecem a conservação do produto, já apresentaram perda maior que 5 % dos analitos;

- ✓ As amostras de extratos comerciais avaliados apresentaram comportamento diferente ao das amostras utilizadas, talvez por alguma diferença no processo de produção destes extratos;
- ✓ As drogas vegetais comerciais apresentaram teor de cumarina diferente comparando-se com o teor das amostras analisadas no estudo. Comercialmente são identificadas como *M. glomerata*, mas a maioria delas apresentou o perfil químico semelhante a *M. laevigata*;
- ✓ As plantas obtidas de diferentes regiões do Brasil, chamadas popularmente como guaco, porém sem identificação botânica, não apresentam o perfil semelhante ao das amostras identificadas botanicamente. Sendo assim, não é possível dizer se são *M. glomerata* ou *M. laevigata*.

Por fim, a continuação deste trabalho poderá trazer maiores esclarecimentos sobre as espécies estudadas. A realização de um estudo amplo sobre a botânica e a química de diferentes amostras de guaco cultivadas em diferentes regiões do Brasil, poderá trazer ricas informações sobre esta planta de tamanha importância para a população brasileira.

6 Bibliografia

1. Rezende, H.A.; Cocco, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.3, p. 282-288, 2002.
2. Pinto, A.C., *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, V.25, p. 45-61, 2002.
3. Agra, M.d.F., *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 472-508, 2008.
4. Organization, W.H., WHO monographs on selected medicinal plants. 1999. v.1, p. 295. WHO Library Cataloguing in Publication Data.
5. Silva, C.R., *et al.* Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 594-599, 2008.
6. Gasparetto, J.C., *et al.* *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 627-640, 2010.
7. Lima, N.P., *et al.* Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura Brasileira**, v.21, p. 106-109, 2003.
8. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.
9. Brandão, M.G.L., *et al.*, Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 127-134, 2008.
10. Farmacopéia Brasileira 2005. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, sexto fascículo.
11. Bolina, R.C., Garcia, E.E., Duarte, M.G.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 294-298, 2009.
12. Yatsuda, R., *et al.* Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 183-189, 2005.
13. Veneziani, R.C.S., Camilo, D., and Oliveira, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p. 99-102, 1999.
14. Ferreira, F.P., Oliveira, D.C.R. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v.51, p. 6856-6859, 2010.
15. Vilegas, J.H.Y., de Marchi, E., Lancas, F.M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. **Phytochemical Analysis**, v.8 p. 266-270, 1997.

16. Fierro, I.M., *et al.* Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p. 19-24, 1999.
17. Soares de Moura, R., *et al.* Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.54 p. 249-256, 2002.
18. dos Santos, S.C., *et al.* LC Characterisation of Guaco Medicinal Extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their Effects on Allergic Pneumonitis. **Planta Medica**, v.72 p. 679-684, 2006.
19. Costa, R.J., *et al.* In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118 p. 86-93, 2008.
20. Biguetti, A.E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schulpz Bip.** 1999. 100 p. Campinas: Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
21. Biavatti, M.W., *et al.* Coumarin Content and Physicochemical Profile of *Mikania laevigata* Extracts. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.59, p. 197-200, 2004.
22. Bighetti, A.E., *et al.*, Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v.12, p. 72-77, 2005.
23. Graça, C., *et al.* In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. *ex Baker* in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112 p. 430-439, 2007.
24. Vilegas, J.H.Y., de Marchi, E., Lancas, F.M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 266-270, 1997.
25. Neves L.J., Sá M.F.A. Contribuição ao estudo de plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 72, p.42-47, 1991.
26. do Amaral, R.R., *et al.* Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13 p. 24-27, 2003.
27. Pedroso, A.P.D., *et al.* Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 p. 63-69, 2008.
28. Duarte, M.C.T., *et al.* Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 305-311, 2005.
29. Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Rodrigues, M. V. N. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. *ex Baker* and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p. 116-118, 2006.

30. Aboy, A.L., *et al.* Atividade Antiespasmódica de Soluções extrativas de Folhas de *Mikania glomerata Sprengel* (guaco). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, p. 185-191, 2002.
31. Suyenaga, E.S., *et al.* Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v.16, p. 519-523, 2002.
32. Portaria GM N°3.237, *Ministério da Saúde*, 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde.
33. ANVISA, *Instrução Normativa N°5 de 11 de dezembro de 2008*. Determina a publicação da "LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO".
34. Brasil, A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas da Central de Medicamentos. Ministério da Saúde, 2006, 148 p.
35. ANVISA, *Resolução - RDC N° 14, de 31 de Março de 2010*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
36. ANVISA, *Resolução - RE N° 1, de 29 de julho de 2005*. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade.
37. Amaral, M.P.H., *et al.* Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 p. 607-611, 2009.
38. Celeghini, R.M.S., Vilegas, J.H.Y., Lanças, F.M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata Spreng*: ("guaco") Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12 p. 706-709, 2001.
39. Bertolucci, S.K.V., *et al.* Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v.75 p. 280-285, 2009.
40. Muceneeki, R., *et al.* A Simple and Validated LC Method for the Simultaneous Determination of Three Compounds in *Mikania laevigata* Extracts. **Chromatographia**, v.69, p. 219-223, 2009.
41. Wolfender, J.L., Rodriguez, S., Hostettmann, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v.794, p. 299-316, 1998.
42. Cole, R.B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry-fundamentals, Instrumentation & Applications**. New York: John Wiley&Sons, 1997. 577 p.
43. Niessen, W.M.A., Tinke, A.P. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. **Journal of Chromatography A**, v.703, p. 37-57, 1995.
44. Niessen, W.M.A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.856, p. 179-197, 1999.
45. Glish, G.L., Vachet R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 140-150, 2003.

46. Korfmacher, W.A., Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10, p. 1357-1367, 2005.
47. Sawaya, A.C.H.F., **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 103 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 2006.
48. Gasparetto, J.C., **Determinação De Metabólitos Secundários Do Guaco Nas Especialidades Farmacêuticas Xarope E Solução Oral Via CLAE-DAD E CLAE-EM/EM**. 2010. 236 p. Dissertação de Mestrado, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná 2010.
49. Cataldi, T.R.I., Bianco, G., Abate, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v.43 p. 82-96, 2008.
50. Dooley, K.C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v.36 p. 471-481, 2003.
51. Maldaner, L., I.C.S.F. Jardim, *O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência*. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.
52. Maldaner, L., Jardim, I.C.S.F. UHPLC - Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v.3, p. 197-207, 2012.
53. Nováková, L., Vlčková, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 65, p. 8-35, 2009.
54. Guillaume, D., *et al.* Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.29 p. 15-27, 2010.
55. Majors, R.E., New chromatography columns and accessories at Pittcon 2011. **LCGC North America, Part I** v.29, p. 218-235, 2011.
56. ANVISA, *Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"*.
57. Economou, A., *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 5856-5867, 2009.
58. Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.
59. Silva, A.I., Santana, C. S., Pivato, S. C. L., De Maria, C. A. B., Moreira, R. F. A., Chlorogenic acid profile of commercial Brazilian herbal infusions. **Sciences des Aliments**, v.26, p. 187-194, 2006.
60. Ribani, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.