

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Thais Morais de Brito

**Determinação de resíduos de agrotóxico, teor de cumarina e
avaliação da atividade farmacológica de tinturas a base de *Mikania
glomerata* Spreng. (Guaco) comercializadas no Estado do
Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2022

Thais Morais de Brito

Determinação de resíduos de agrotóxico, teor de cumarina e avaliação da atividade farmacológica de tinturas a base de *Mikania glomerata* Spreng. (Guaco) comercializadas no Estado do Rio de Janeiro

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadores: Fausto Klabund Ferraris

Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2022

Catlogação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

de Brito, Thais Morais

Determinação de resíduos de agrotóxico, teor de cumarina e avaliação da atividade farmacológica de tinturas a base de Mikania glomerata Spreng (Guaco) comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. / Thais Morais de Brito. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

142 f.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Fausto Klabund Ferraris.

Co-orientador: Armi Wanderley da Nóbrega.

1. Mikania glomerata Spreng. 2. Cumarina. 3. Agrotóxico. 4. Controle de Qualidade. 5. RENISUS. I. Título.

Determination of pesticide residues, coumarin content and evaluation of the pharmacological activity of tinctures based on Mikania glomerata Spreng (Guaco) marketed in the State of Rio de Janeiro.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Thais Morais de Brito

Determinação de resíduos de agrotóxico, teor de cumarina e avaliação da atividade farmacológica de tinturas a base de *Mikania glomerata* Spreng. (Guaco) comercializadas no Estado do Rio de Janeiro

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em 12 / 12 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – RJ

Dr. Leandro Machado Rocha
Universidade Federal Fluminense – RJ

Dra. Lucia Helena Pinto Bastos
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – RJ

ORIENTADORES

Dr. Fausto Klabund Ferraris – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – RJ

Dr. Armi Wanderley da Nóbrega - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - RJ

Dedico este trabalho ao meu avô, Luiz Mesquita de Brito (*in memoriam*), que me ensinou o verdadeiro significado da força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus queridos pais, Elizabeth de Brito e Thales dos Santos, por todo apoio e incentivo ao longo da vida. Sempre muito preocupados com os meus estudos, me incentivaram e respeitaram minhas decisões mesmo sabendo que o caminho seria o mais longo. Eu os amo.

Ao meu marido, Aldo Júnior, que pegou esse trem em movimento, mas conduziu com bastante paciência e compreensão nos momentos de estresse e tensão.

Aos Drs. Fausto Ferraris e Fabio Amendoeira por terem tornado possível a minha inserção no mundo acadêmico, e por todas as oportunidades que me foram dadas desde a iniciação científica até a atualidade. Vocês foram capazes de enxergar em mim, um potencial que nem eu sabia que existia.

À família LabFar por tudo. Tudo de maravilhoso que foi vivido e compartilhado ao longo do desenvolvimento desse projeto. Todos os momentos de correria em dias de experimento, de estresse em época de prazos, de alegria extrema nos dias de confraternização, e principalmente de loucura no dia a dia. A vocês, Fabio, Fausto, Júlia Loureiro, Fernanda Moura, Naína Monsores, Nathália Souza, Amanda Alves, Yasmin Pinheiro, o meu mais sincero obrigada.

Ao Esdras Garcia, por todos esses anos de amizade e orientação, por todas as vezes que deixei a peteca cair e você a levantou, por todas às bobagens que me levaram a lágrimas de alegria e por ter acreditado em mim em todas as vezes que eu não acreditei.

À equipe do Setor de Análise de Resíduos em Agrotóxicos, em especial as Dras. Lucia Helena e Angélica Castanheira, por todas as horas de ensinamentos e parceria ao longo desse projeto.

Ao Dr. Leandro Rocha por tornar esse projeto possível, sendo um colaborador valioso e muito solícito do nosso grupo há anos.

Ao Dr. Armi da Nóbrega por ter aceitado a parceria com o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, tornando possível uma linha de pesquisa importante do projeto.

À Tatiana Pádua e ao Thadeu Costa, pelas incontáveis colaborações e doações ao longo desses anos de trabalho.

Ao INCQS, a Farmanguinhos e a Faperj pelo apoio.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou
o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A *Mikania glomerata* está presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, sendo seus extratos, tinturas e xaropes utilizados no tratamento complementar de doenças do trato respiratório como: bronquite e asma. A *M. glomerata* vem sendo utilizada pela população e por empresas privadas e públicas, sendo que a Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (RJ), através das Farmácias Vivas, faz a distribuição da espécie em estudo para uso terapêutico complementar. Foi objetivo desse trabalho, analisar a qualidade de tinturas de *M. glomerata* a 10%, comercializadas no Estado do RJ, utilizando ensaios preconizados em sua monografia, seguindo critérios das RDCs 26/2014 e 105/2016, associados a ensaios de atividade farmacológica. Camundongos Balb/C pré-tratados 1 hora antes com a tintura de referência a 10% (TR = 1, 10, 30 e 100 mg/kg) foram estimulados com uma injeção intra-torácica contendo ovalbumina (OVA). Todas as doses foram capazes de reduzir de forma significativa o infiltrado leucocitário total e a população de eosinófilos, em comparação ao grupo OVA. Foi utilizado o ensaio *in vitro* de produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos para determinação da eficácia das diferentes tinturas comercializadas. A tintura comercial Tijuca (TCT) e a tintura comercial Barra da Tijuca (TCB) apresentaram baixa efetividade em todas as diluições quando comparadas com a TR. A tintura comercial Flamengo (TCF) e Gávea (TCG) reduziram a produção de NO até a diluição de 1/500, sendo superadas apenas pela tintura comercial Ilha do Governador (TCI) que apresentou efeito até a diluição 1/1000. As TCs com baixa atividade farmacológica apresentaram 8,3 e 38,4 µg/mL de Cumarina (CMR), enquanto que a TR continha 369,3 µg/mL. A TCG e TCI revelaram valores próximos a TR (225,7 e 488,1 µg/mL, respectivamente). Quanto a TCF houve uma grande variação do valor de CMR entre lotes (234,5 µg/mL de variação). Após a validação do método analítico para a análise de 268 agrotóxicos, na matriz de tintura de *M. glomerata* a 10%, em CLUE-EM/EM, foram encontrados traços de carbendazim e dimetomorfe em 4 amostras. As análises comparativas das TCs evidenciaram um desvio de qualidade acentuado nos produtos que estão sendo ofertados para a população do RJ. Além da ausência de atividade terapêutica, provavelmente relacionada com a variação de CMR, também foi encontrado resíduo de fungicidas em algumas amostras. Esses dados demonstram claramente a necessidade da padronização das matérias-primas e dos processos extrativos, bem como uma maior atuação das agências regulatórias.

Palavras-chave: *Mikania glomerata* Spreng. Cumarina. Agrotóxico. Controle de Qualidade. RENISUS.

ABSTRACT

Mikania glomerata is present in the Phytotherapy Form of the Brazilian Pharmacopoeia, and its extracts, tinctures and syrups are used in the complementary treatment of respiratory tract diseases such as: bronchitis and asthma. *M. glomerata* has been used by the population and private and public companies, and the Municipal Health Department of the State of Rio de Janeiro (RJ), through “*Farmácias Vivas*”, distributes the species under study for complementary therapeutic use. This study aimed to analyze the quality of *M. glomerata*'s tinctures 10%, sold in the RJ State, using tests recommended in its monograph, following RDCs 26/2014 and 105/2016 criteria, associated with pharmacological tests. Balb/C mice pre-treated 1 hour before with the 10% reference tincture (RT = 1, 10, 30 and 100 mg/kg) were stimulated with an intra-thoracic injection containing ovalbumin (OVA). All doses significantly reduce the total leukocyte and eosinophil population infiltrate compared to the OVA group. The in vitro assay of Nitric Oxide (NO) production in macrophages was used to determine the effectiveness of different commercial tinctures. The Tijuca commercial tincture (CTT) and the Barra da Tijuca commercial tincture (CTB) showed low effectiveness in all dilutions compared to RT. The Flamengo commercial tincture (CTF) and Gávea (CTG) reduced NO production up to a dilution of 1/500, being surpassed only by the Ilha do Governador commercial tincture (CTI) which showed an effect at a dilution of 1/1000. CTs with low pharmacological activity showed 8.3 and 38.4 $\mu\text{g/mL}$ of Coumarin (CMR), while RT contained 369.3 $\mu\text{g/mL}$. CTG and CTI revealed values close to TR (225.7 and 488.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively). As for CTF, there was a large variation in the CMR value between batches (234.5 $\mu\text{g/mL}$ of variation). After validation of the analytical method for the analysis of 268 pesticides, in the 10% *M. glomerata* tincture matrix, in UPLC-MS/MS, traces of carbendazim and dimethomorph were found in 4 samples. In addition to the absence of therapeutic activity, probably related to the CMR variation, fungicide residue was also found in some samples. These data clearly demonstrate the need for the standardization of raw materials and extractive processes, as well as greater action by regulatory agencies.

Keywords: *Mikania glomerata* Spreng. Coumarin. Pesticides. Quality control. RENISUS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Monitoramento das mudanças nos indicadores de progresso definidos pela Estratégia de Medicina Tradicional nos Estados-membros (EM)	20
Figura 2: Folhas de <i>Mikania glomerata</i> Spreng. coletadas no horto de Volta Redonda, RJ.....	23
Figura 3: Rota Biossintética e estrutura química da cumarina.....	26
Figura 4: Rota biossintética e fórmula estrutural dos ácidos clorogênicos.....	27
Quadro 1: Classificação dos agrotóxicos de acordo com os grupos químicos, o grau toxicológico e pela finalidade a qual se destina.....	33
Quadro 2: Classificação e efeitos/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.....	34
Quadro 3: Condições CLUE-EM/EM para validação do método analítico	50
Figura 5: Ilustração do método de fortificação.....	52
Figura 6: Avaliação da cor das tinturas de Guaco de referência e das amostras comerciais.....	59
Figura 7: Avaliação da capacidade inibitória da Tintura de Referência de Guaco frente à inoculação de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella sp.</i>	63
Figura 8: Cromatograma do padrão de cumarina e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.....	65
Figura 9: Cromatograma da Tintura Guaco Referência e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina	66
Figura 10: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Flamengo e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina	67
Figura 11: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Ilha e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina	68

Figura 12: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Gávea e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.	69
Figura 13: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Barra e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.....	70
Figura 14: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Tijuca, e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.	71
Figura 15: Efeito <i>in vivo</i> da tintura de Guaco referência (L1) na pleurisia alérgica.....	75
Figura 16: Efeito <i>in vivo</i> da tintura de Guaco referência (L2) na pleurisia alérgica.....	76
Figura 17: Efeito <i>in vivo</i> das tinturas de Guaco referência (L1) e comercial (TCG-L1) na pleurisia alérgica.....	78
Figura 18: Produção de NO em células da linhagem J774A.1 estimuladas com LPS e tratadas com tintura de Guaco de referência.....	81
Figura 19: Produção de NO em células da linhagem AMJ2-C11 estimuladas com LPS e tratadas com tinturas de Guaco de referência (L1) e comerciais (L1)	83
Figura 20: Percental de inibição da produção de NO em macrófagos tratados com a TR-L2 e TCS-L2	85
Figura 21: Percental de inibição da produção de NO em macrófagos tratados com a TR-L2 e TCS-L3.....	86
Quadro 4: Relação de CMR presente nas doses de TR-L2 utilizadas <i>in vivo</i>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente utilizado no método de identificação da cumarina na matriz tintura de Guaco.....	44
Tabela 2: Gradiente de eluição empregado na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C18.	49
Tabela 3: Soluções usadas no preparo da curva analítica.....	51
Tabela 4: Análise de rótulo de três lotes de tinturas de Guaco 10% comercializadas em diferentes bairros do estado do Rio de Janeiro, segundo critérios das RDCs 67/2007, 71/2009 e 18/2013.....	56
Tabela 5: Avaliação das características organolépticas da tintura de Guaco referência e amostras comerciais.....	58
Tabela 6: Determinação do resíduo seco em tintura de Guaco referência e amostras comerciais, seguindo as metodologias farmacopeicas de evaporação e secagem.....	61
Tabela 7: Avaliação microbiológica da tintura de Guaco referência e amostras comerciais, seguindo as metodologias farmacopeicas.....	64
Tabela 8: Concentração de cumarina, em tinturas de Guaco comercial, calculada através da curva analítica (área).	73
Tabela 9: Efeito citotóxico da tintura de Guaco referência em linhagem de macrófagos murinos, J774A.1.....	80
Tabela 10: Efeito citotóxico das tinturas de Guaco referência e comerciais em linhagem de macrófagos pulmonares murinos, AMJ2-C11.....	80
Tabela 11: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras comerciais de Guaco, por CLUE-EM/EM.....	90
Tabela 12: Publicações nacionais recentes sobre o doseamento de CMR em <i>M. glomerata</i>	96

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Valores encontrados para r e R^2	123
APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão.....	127
APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão.....	132
APÊNDICE D – IAs validados para a matriz tintura de <i>M. glomerata</i> 10% em CLUE-EM/EM.....	139

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACL – Ácido clorogênico

ADC – Ácido Dicafeoilquínico

ACN – Acetonitrila

ACU – Ácido Caurenóico

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATF - Ácido trifluoracético

BCRJ – Banco de Células do Estado do Rio de Janeiro

BHC – Hexaclorobenzeno

CBZ – Carbendazim

CD4⁺ - Cluster of differentiation 4

CE – Ceará

CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animais

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CMR – Cumarina

COVID 19 – Coronavirus disease 2019/ Doença do coronavírus 2019

CV - Coeficiente de variação

DAD - Arranjo de diodocon A

DDE – Dicloro Difenil Dicloroetileno

DDT – Dicloro Difenil Tricloroetano

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF - Dimetomorfe

DP – Desvio padrão

ELAM-1 – Endothelial-leukocyte adhesion-1/ Molécula de adesão endotélio-leucócito -1

EM - Espectrometria de Massa

EM/EM - Espectrometria de Massa Sequencial

ESI - Ionização por eletrospray

FFFB - Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

gts - gotas

IAs – Ingredientes ativos

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1/ Molécula de adesão intercelular -1

ICTB - Instituto de Ciência em Tecnologia e Biomodelos

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IFN- γ – Interferon γ

IL – Interleucina

IN – Instrução Normativa

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRAK-1 - Interleukin-1 receptor-associated kinase / Cinase associada ao receptor de interleucina-1

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LPS – Lipopolissacarídeo

LQM – Limite de Quantificação do Método

LTPN-UFF – Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da Universidade Federal Fluminense

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAPK - Mitogen-activated protein kinase/ Proteína quinase ativada por mitógeno

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MTA – Medicina Tradicional Alternativa

MTT - thiazolyl blue tetrazolium bromide/ Brometo de Tiazolil Azul de Tetrazólio

mRNA - Messenger ribonucleic acid / Ácido ribonucleico mensageiro

NF- κ B - Factor nuclear kappa B/ Fato de transcrição nuclear kappa B

NO – Nitric oxide/ óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVA – Ovalbumina

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBS – Phosphate buffered saline/ Tampão fosfato-salino

p.c. – peso corpóreo

pH – potencial de hidrogênio

PNPMF – Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PPMF/SMS - O Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia da Secretaria Municipal de Saúde.

p/v – peso/ volume

q.s.p – quantidade suficiente para

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

Rec. – Recuperação

RJ – Rio de Janeiro

RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium

Rs – Reduction, Replacement and Refinement/ Redução, substituição e refinamento

SAB - Sabouraud-dextrose

RS – Rio Grande do Sul

SFB – Soro Fetal Bovino

Sinan - Sistema de Informações de Agravos de Notificação

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SP – São Paulo

SUS – Sistema Único de Saúde

TABNET – Tabulador de dados do sistema de informática do SUS

TC(s) – Tinturas(s) comercial(ais)

TCB – Tintura comercial da Barra da Tijuca

TCF - Tintura comercial do Flamengo

TCG - Tintura comercial da Gávea

TCI - Tintura comercial da Ilha do Governador

TCT - Tintura comercial da Tijuca

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

TR – Tintura de referência

Tr – Tempo de retenção

TSA - Triptona de Soja

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule-1/ Molécula de adesão celular vascular-1

v.o. – via oral

v/v – volume/ volume

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

UV/VIS - Espectrofotometria de Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Programa de Medicina Tradicional e Complementar	21
1.1.1 Programa farmácias vivas.....	21
1.2 <i>Mikania glomerata</i> Spreng	23
1.2.1 Etnofarmacologia e estudos de atividade farmacológica.....	24
1.2.2 Perfil fitoquímico.....	25
1.3 Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil	28
1.3.1 Agrotóxicos.....	31
2. RELEVÂNCIA	38
3. OBJETIVO	40
3.1 Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA	41
4.1 Droga vegetal e amostras de tintura	41
4.2 Preparo do derivado vegetal	41
4.3 Análise de rótulo	41
4.4 Caracterização organoléptica	42
4.5 Determinação do resíduo seco	42
4.6 Investigação microbiológica	42
4.7 Caracterização fitoquímica	43
4.7.1 Equipamentos utilizados.....	44
4.7.2 Insumos utilizados.....	44
4.8 Cultivo celular	44
4.8.1 Extração de células primárias.....	45
4.9 Análise da viabilidade celular	45
4.10 Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	46
4.11 Animais	46
4.12 Pleurisia alérgica induzida por ovalbumina	47
4.13 Análise estatística dos ensaios farmacológicos	47
4.14 Estudo de resíduo de agrotóxico	47
4.14.1 Equipamentos utilizados.....	48
4.14.2 Insumos utilizados.....	48

4.14.3	Análises por CLUE-EM-/EM.....	49
4.14.4	Validação.....	50
4.14.4.1	<i>Seletividade e efeito matriz</i>	50
4.14.4.2	<i>Faixa de trabalho e linearidade</i>	51
4.14.4.3	<i>Precisão / Repetibilidade e Exatidão / Taxa de recuperação</i>	52
4.14.4.4	<i>Implementação do método validado em amostras comerciais</i>	53
5.	RESULTADOS	55
5.1	Análise de rótulo de tinturas comerciais de Guaco 10%	55
5.2	Caracterização organoléptica em tinturas de Guaco referência e comerciais	57
5.3	Determinação do resíduo seco em tinturas de Guaco referência e comerciais	60
5.4	Investigação microbiológica em tinturas de Guaco referência e comerciais	62
5.5	Identificação da cumarina em tinturas de Guaco por CLAE-UV-DAD	65
5.6	Quantificação da cumarina em tinturas de Guaco por CLAE-UV-DAD	72
5.7	Efeitos <i>in vivo</i> das tinturas de Guaco referência na pleurisia induzida por OVA	74
5.8	Efeitos <i>in vivo</i> da tintura de Guaco comercial na pleurisia induzida por OVA	77
5.9	Análise do efeito citotóxico das tinturas de Guaco referência e comerciais em linhagens J774A.1 e AMJ2-C11	79
5.10	Avaliação da capacidade inibitória da tintura de Guaco referência na produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> em linhagem J774A.1	81
5.11	Avaliação da capacidade inibitória das tinturas de Guaco referência e comerciais na produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> em linhagem AMJ2-C11	82
5.12	Avaliação da capacidade inibitória das tinturas de Guaco referência e comerciais na produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> em cultura de macrófagos primários	84

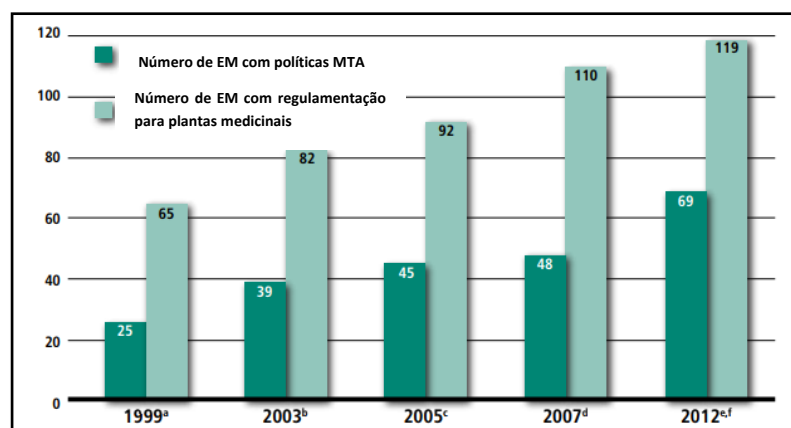
5.13 Validação de método analítico por CLUE-EM/EM para estudo de resíduo de agrotóxico em matriz tintura de <i>M. glomerata</i> 10%.....	87
5.13.1 Seletividade.....	87
5.13.2 Faixa de trabalho/linearidade.....	87
5.13.3 Precisão/ repetibilidade	87
5.13.4 Exatidão/taxa de recuperação.....	88
5.13.5 Ingredientes ativos validados.....	88
5.14 Análise de resíduos de agrotóxicos em tinturas comerciais de Guaco.....	89
6. DISCUSSÃO.....	91
7. CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICES.....	123

1. INTRODUÇÃO

No final da década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente o uso da Medicina Tradicional Alternativa (MTA). Entende-se por Medicina Tradicional “a soma de conhecimentos, habilidades, e práticas voltadas à saúde, baseadas em teorias, crenças, e experiências próprias, com explicação científica ou não, que tem por objetivo manter a saúde, diagnosticar, tratar ou curar enfermidades físicas e mentais” (WHO, 2013).

A partir da elaboração da primeira grande “Estratégia de Medicina Tradicional” em 2002, a OMS definiu as diretrizes que teve como objetivo construir bases de conhecimento e políticas nacionais, fortalecendo a segurança, qualidade e eficácia através de regulamentações, e promovendo cobertura universal à saúde através da integração das práticas complementares, reconhecidamente eficazes e seguras, aos sistemas oficiais e de atenção básica existentes. Ao longo de uma década, após sua elaboração, o plano estratégico demonstrou progresso quanto ao número de países aderentes a implementação de políticas referentes a MTA (Figura 1), esse plano estratégico foi atualizado em 2013, com o intuito de suprir as necessidades provenientes da demanda de consumidores de produtos e serviços referente à MTA (WHO, 2013).

Figura 1: Monitoramento das mudanças nos indicadores de progresso definidos pela Estratégia de Medicina Tradicional nos Estados-membros (EM) – OMS.



Fonte (adaptado): WHO, 2013.

1.1 Programa de Medicina Tradicional e Complementar

O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo, sendo estimado que o território nacional possua entre 15 a 20% da biodiversidade do planeta, abarcando mais de 46.096 espécies de plantas em mais de nove diferentes ecossistemas (BRASIL, 2016a; CARVALHO et al, 2018). Além desse vasto acervo genético, o Brasil também ganha destaque na diversidade étnica e cultural, com um valioso conhecimento tradicional, passado de geração para geração, associado ao uso de plantas medicinais (BRASIL, 2016a). Tendo em vista a capacidade do país em desenvolver pesquisas com resultados em tecnologias e terapias adequadas, o Ministério da Saúde Brasileiro, no final da década de 80, após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), legitimou e institucionalizou as abordagens de atenção à saúde, preconizadas pela OMS, para a inserção da Medicina Tradicional, através da Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares no SUS (BRASIL, 2005), e um ano depois, o Brasil foi contemplado com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2016a).

Em 2009, foi instituído no país o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa: “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2009a). A promoção do acesso aos medicamentos fitoterápicos teve início em 2007, sendo que a partir do PNPMF, foi criada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), e em 2010, foi instituído o Programa Farmácia Viva no âmbito do SUS (AMORIM, 2012). O RENISUS consiste em uma lista com 71 espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde municipais e estaduais, que por possuírem comprovação de eficácia através de estudos etnofarmacológicos, podem avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2014a; OSHIRO et al, 2016).

1.1.1 Programa farmácias vivas

Com o objetivo de respaldar as várias iniciativas das secretarias estaduais e municipais do país que desenvolvem programas de fitoterapia, foram instituídas as Farmácias Vivas no âmbito do SUS. Este programa determina as etapas que deverão

ser realizadas por cada Estado ou Município, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento das plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos.

Dresch e Carvalho (2022) elencaram 82 projetos e programas relacionados às Farmácias Vivas ou Fitoterapia com grande representatividade no país. Destes, 29 estão em seu pleno funcionamento, 38 estão em fase de estruturação, 7 em implantação, 4 projetos foram descontinuados, 2 paralisados e 2 suspensos por tempo indeterminado. O Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (PPMF/SMS-RJ), existente oficialmente desde 1992, oferta medicamentos fitoterápicos manipulados através das Farmácias Vivas desde 2010 (AMORIM, 2012). Atualmente, as Farmácias Vivas de Niterói e Cachoeiras de Macacu estão em processo de estruturação, a de Quissamã, existente desde 2019, está em processo de implantação para a produção de chá medicinal, e a de Volta Redonda atua desde 2011 seguindo as diretrizes do PPMF/SMS-RJ (DRESCH; CARVALHO, 2022).

O cultivo de espécies medicinais ocorre em Guaratiba no horto da Fazenda Modelo, no Município do RJ, com o objetivo de fornecer matéria-prima vegetal para a produção de fitoterápicos, implantação de hortas e para a realização de oficinas de cultivo, promoção de saúde e geração de renda em unidades de saúde. O material vegetal coletado no horto é encaminhado para a Farmácia de Manipulação de Fitoterápicos do Município do RJ, localizada no Hospital Municipal Raphael de Paula e Souza, em Curicica, Jacarepaguá. De lá são produzidos em torno de 6 mil medicamentos por mês e que irão abastecer em torno de 1852 unidades de saúde básica (RIO DE JANEIRO, 2016; DRESCH; CARVALHO, 2022).

A produção de cremes fitoterápicos pelas farmácias de manipulação do município, a prescrição destes e de outros fitoterápicos industrializados por profissionais habilitados, assim como assistência farmacêutica prestada a partir da dispensação dos mesmos, são algumas das diretrizes do PPMF/SMS-RJ. Em torno de 19 plantas medicinais fazem parte da lista de espécies vegetais ofertadas pelo município, entre elas está a *Mikania glomerata* Spreng. (AMORIM, 2012; RIO DE JANEIRO, 2015).

A *Mikania glomerata* está presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB), 2ª edição (BRASIL, 2021a), e assim como sua monografia específica (BRASIL, 2018a), empregam a produção e a utilização de seus extratos, tinturas e xaropes no tratamento complementar de doenças do trato respiratório como: bronquite e asma. É uma das plantas mais utilizadas no PPMF/SMS-RJ, atualmente conta com 18 medicamentos registrados junto à ANVISA, em produtos formulados, e também integra a RENISUS (AMORIM, 2015; CARVALHO et al, 2018; BRASIL, 2018a; BRASIL, 2021a, BRASIL, 2022a).

1.2 *Mikania glomerata* Spreng.

Dentre as 171 espécies vegetais do gênero *Mikania* encontradas no Brasil, a *Mikania glomerata* Spreng. é uma planta da família Asteraceae, nativa da Mata Atlântica do Brasil, sendo encontrada no interior de florestas e litorais, predominantemente no sul e sudeste do país, com maior dispersão nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. É um subarbusto silvestre, escandente, de folhagem densa e perene. Suas folhas são pecioladas, ovalanceoladas, tri ou pentanervadas, e agudas no ápice, com forte aroma remanescente de baunilha (Figura 2). Floresce no mês de janeiro, em inflorescências brancas e panículadas, sendo de bastante interesse das abelhas melíferas (OSORIO, 2002; BUDEL et al, 2009; NAPIMOGA; YATSUDA, 2010; SILVA, 2012; BRASIL, 2018a).

Figura 2: Folhas de *Mikania glomerata* Spreng. coletadas no horto de Volta Redonda, RJ.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

1.2.1 Etnofarmacologia e estudos de atividade farmacológica

A *M. glomerata*, tem como sinonímia botânica; *Mikania hatschbachii* GM Barroso, *Willoughbya glomerata* (Spreng) Kuntze, *Mikania glomerata* var *montana* Hassl, *Mikania scansoria* DC e *Cacalia trilobata* Vell, e é popularmente conhecida como guaco, guaco-cheiroso, guaco-liso, guaco-trepador, cipó-catinga, erva-de-cobra ou coração-de-Jesus, e é utilizada na medicina popular brasileira há tempos por povos indígenas. O chá de folhas do guaco era consumido por via oral em caso de picadas de cobra (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010), assim como a aplicação das folhas ou suco do caule sobre as picadas como medidas emergenciais. A espécie é utilizada popularmente também nos casos de asma, bronquite, como adjuvante no combate à tosse, e cicatrizante de feridas e eczemas. É atribuído a ela ainda, as atividades anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antirreumática, antipirética, antigripal, antiviral e estimulante do apetite (ALVARENGA et al, 2009; NAPIMOGA; YATSUDA, 2010; CZELUSNIAK et al, 2012; BRASIL, 2014b).

Alguns estudos demonstram potencial de atividade antialérgica, analgésica, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Em modelo de pleurisia alérgica em ratos Wistar machos, Fierro e colaboradores (1999), evidenciaram a capacidade antialérgica do extrato etanólico de folhas de *M. glomerata*, através da redução da degranulação de mastócitos e das populações de neutrófilos e eosinófilos infiltrados na cavidade pleural de animais tratados, quando comparado ao grupo de animais que foram apenas estimulados com ovalbumina (OVA). O extrato etanólico das folhas de *M. glomerata* foi capaz de reduzir a infiltração inflamatória causada pela exposição ao pó de carvão, em um modelo experimental *in vivo* de pneumoconiose induzida, sugerindo o potencial profilático em casos de lesão pulmonar oxidativa (FREITAS, 2008). Foi observado por Moura e colaboradores (2002), a ação inibitória significativa da contração de músculo liso traqueal isolado de cobaias, e da broncoconstrição de tecido humano isolado, na presença do extrato hidro-alcoólico de *M. glomerata*. (MOURA et al, 2002).

Outros trabalhos como o de Mourão e colaboradores (2014) demonstraram o potencial anti-inflamatório e anti-hemorragico do extrato hidro-alcoólico de *M. glomerata* em modelo *in vivo* com estímulo de veneno botrópico de Jararaca. Os valores de leucócitos totais e área hemorrágica após 3 horas da administração

intradérmica do veneno concomitantemente com o extrato (12,8 µg/µL), não alcançaram os altos valores observados no grupo que recebeu apenas o veneno. Além disso, a atividade da fosfolipase A2 foi inibida nos grupos tratados com o extrato (MOURÃO et al, 2014).

E mais recentemente, Della Pasqua e colaboradores (2019), apresentaram evidências da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *M. glomerata* em modelo de edema de pata induzida por carragenina. Onde as doses de 100, 200 e 400 mg/kg, administradas oralmente em ratos Wistar machos, inibiram de forma significativa a formação do edema em 3 e 4 h após o estímulo. Há ainda autores que sugestionam o uso de *M. glomerata* como adjuvante ao tratamento da COVID-19 devido às suas propriedades expectorante, antitussígena, broncodilatadora, anti-inflamatória e antiviral (SOUZA; et al, 2022). Mas ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados para corroborar tal finalidade.

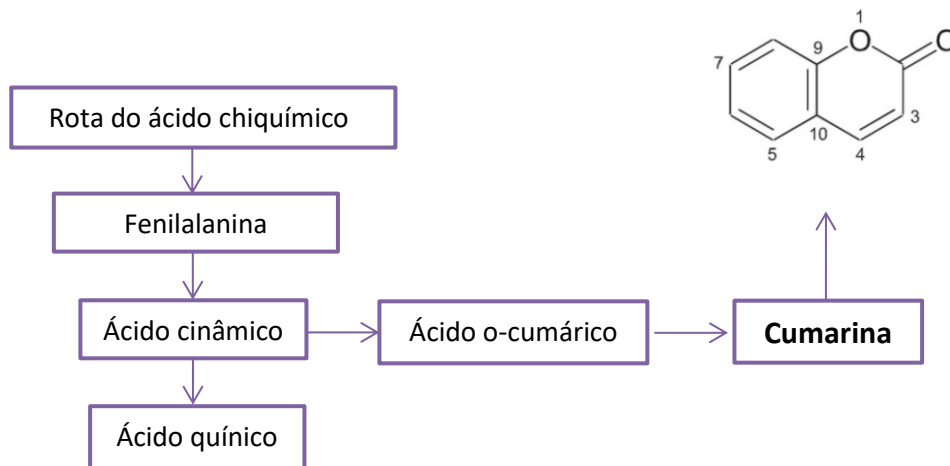
1.2.2 Perfil fitoquímico

Dentre os metabólitos descritos na literatura, destacam-se a cumarina (CMR) e o ácido caurenóico, presentes nas folhas e possuidores de atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória e expectorante. A CMR é relatada como o marcador químico desta espécie e é responsável, parcialmente, pelos efeitos farmacológicos descritos (ALMEIDA et al, 2017; BRASIL, 2018a). Encontram-se também nas folhas de *M. glomerata* terpenos e ácidos orgânicos, dentre eles substâncias como o ácido cinamoilgrandiflórico, estigmasterol, lupeol, ácido clorogênico, ácido dicafeoilquínico, dentre outros. Nos caules da *M. glomerata* foram isolados os compostos: friedelina, ácido caurenóicos, ácido grandiflórico, e nos óleos essenciais o espatulenol, como composto majoritário (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010; CZELUSNIAK et al, 2012; SILVA, 2012).

A cumarina (1,2-benzopirona) é sintetizada nos vegetais a partir do ácido cinâmico, proveniente da rota do ácido chiquímico, após sofrer uma orto-hidroxilação seguida de uma orto-glicosilação e isomerização cis/trans, que induz a lactonização e formação final da CMR (Figura 3) (CZELUSNIAK et al, 2012). Na fisiologia das plantas ela atua como antioxidante e inibidor enzimático, estando envolvida em processos como a respiração, a fotossíntese, o crescimento das espécies e atuando na defesa contra infecções (FRANCO et al 2021). A CMR é descrita como um dos principais

responsáveis pelas atividades farmacológicas da espécie em estudo. O composto está presente em aproximadamente 0,5% das folhas secas, é utilizada no controle de qualidade da produção dos extratos e confere aroma característico às folhas das plantas medicinais (CZELUSNIAK et al, 2012).

Figura 3: Rota Biossintética e estrutura química da cumarina.



Fonte (adaptado): ABREU; SANTOS; KAISER, 2007.

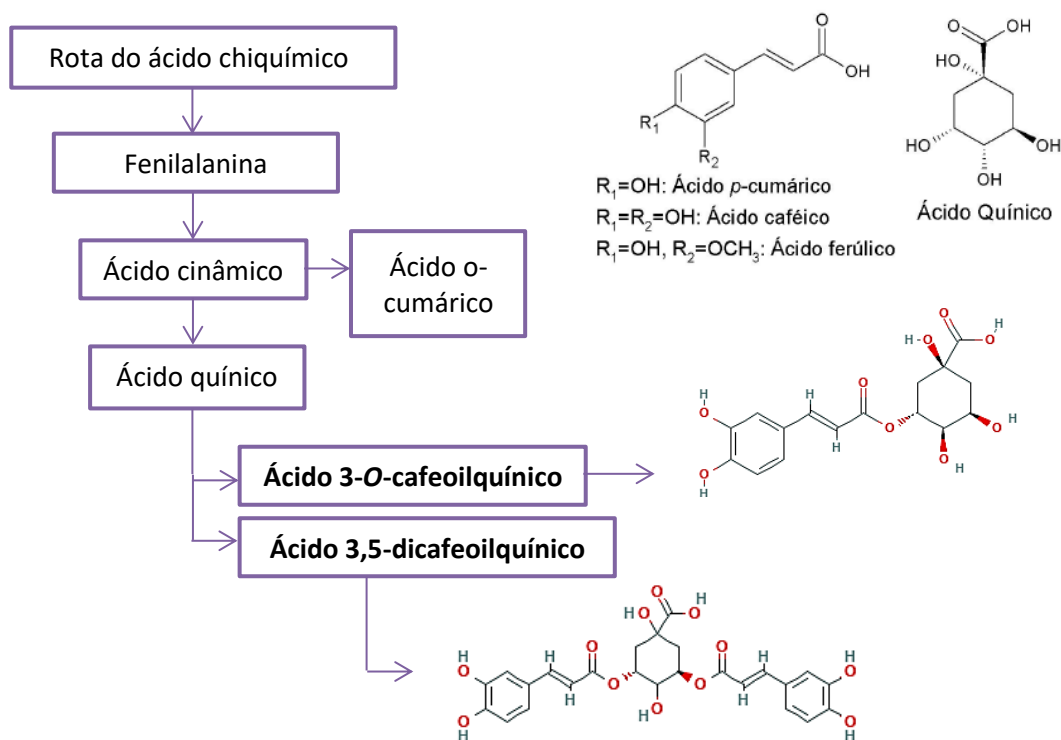
Na literatura pode-se observar o potencial anti-inflamatório de diferentes derivados cumarínicos em modelo de edema de pata induzido por carragenina, onde ratos tratados com derivados cumarínicos apresentaram proteção de até 45% na formação do edema em até três horas após o estímulo (EL-HAGGAR; AL-WABLI, 2015). Esses derivados apresentam ação inibitória, através da ligação com o sítio ativo da enzima ciclooxygenase-2, o mesmo onde atua o fármaco indometacina (LU et al, 2016; SIRIVASTAVA et al, 2016). Também atuam na inibição da ativação de leucócitos polimorfonucleares, redução na produção do mediador inflamatório óxido nítrico, bem como, TNF- α , IL-1 β , IL-6 em cultura de células RAW264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), com evidências de atuação na via de sinalização NF- κ B/MAPK (LI et al, 2013; JANG et al, 2014; ISHITA et al, 2015; FRANCO et al 2021).

Embora a monografia específica da espécie *M. glomerata* aponte a CMR como metabólito secundário majoritário e, por tal motivo, ser o marcador químico da espécie em questão (BRASIL, 2018a), um estudo feito por Almeida e colaboradores (2017) mostrou um perfil químico diferente das folhas da *M. glomerata*. De acordo com um estudo sazonal, avaliando variações de umidade, temperatura, oferta de água e

incidência de luz solar, foram apontados valores muito superiores de ácido dicafeoilquínico (ácido 3,5-dicafeoilquínico), seguido de ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico), quando comparado aos valores de CMR (ALMEIDA et al, 2017; BRASIL, 2018a).

O ácido cafeoilquínico e o ácido dicafeoilquínico na verdade são compostos que integram o grupo dos ácidos clorogênicos. Estes ácidos são compostos fenólicos sintetizados nos vegetais pela via do ácido chiquímico, através da esterificação do ácido quínico (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). O ácido 3-O-cafeoilquínico é composto pela esterificação do ácido quínico com uma única molécula de ácido cafêico, e o ácido 3,5-dicafeoilquínico pela esterificação de duas moléculas do ácido cafêico, conforme figura 4 (MARIA; MOREIRA, 2004).

Figura 4: Rota biossintética e fórmula estrutural dos ácidos clorogênicos.



Fonte (adaptado): OLIVEIRA; BASTOS, 2011; PUBCAM, 2017; PUBCAM, 2018.

A literatura já descreve bem os efeitos e mecanismos anti-inflamatórios dos ácidos clorogênicos. Em modelo experimental *in vivo* de hepatite induzida por Concanavalin A, animais pré-tratados por via oral com ácido clorogênico (30 mg/kg)

foram capazes de reduzir a expressão de mRNA de algumas moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e ELAM-1, atenuando a infiltração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ no fígado, e reduziram os valores das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , quando comparado aos grupos não tratados (YUAN et al, 2017). No mesmo trabalho ainda foi observada a capacidade do ácido clorogênico em reduzir a expressão do receptor Toll-like 4, e inibir a ativação de IRAK-1, NF- κ B e MAPK (YUAN et al, 2017). O ácido clorogênico (12,5; 25 e 50 μ g/mL) foi ainda capaz de inibir a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e a ativação de NF- κ B p65 fosforilado, em células mamárias epiteliais bovina estimuladas com LPS, demonstrando a interrupção de via de ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, corroborando os dados vistos *in vivo* (GAO et al, 2018).

Podemos supor que essas substâncias já identificadas na espécie em estudo, estejam associadas aos efeitos farmacológicos observados. No entanto, como é observado na literatura, não há um padrão bem definido nas proporções de apresentação de cada uma dessas substâncias em produtos comercializados e o seu real comprometimento nos efeitos terapêuticos. Supõem-se que uma espécie possuindo CMR em concentrações reduzidas na época da floração pode apresentar uma atividade anti-inflamatória comprometida (ALMEIDA et al, 2017).

1.3 Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil

Sabe-se que os extratos vegetais podem apresentar em sua composição química uma grande variabilidade devido a fatores ambientais e climáticos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Por isso é necessário a continuidade de estudos que assegurem os parâmetros de qualidade de drogas e dos derivados vegetais produzidos a partir das plantas medicinais, como é recomendado pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2014c).

Os medicamentos fitoterápicos podem ser manipulados ou industrializados, de acordo com a legislação brasileira, e ainda podem ser destinados ao uso humano ou veterinário, sendo regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), respectivamente. A manipulação de medicamentos para uso humano é realizada em

farmácias autorizadas pela Vigilância Sanitária do estado ou município, devendo seguir as normas de boas práticas de manipulação de preparações magistrais e officinais (BRASIL, 2008; BRASIL, 2015a).

Com o intuito de aperfeiçoar o marco regulatório, a legislação brasileira que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos foi atualizada em 2014, através da RDC nº 26, permitindo um melhor acompanhamento do desenvolvimento tecnológico e científico acerca do assunto, e possibilitando a ampliação do acesso destes produtos à população. Apenas os medicamentos fitoterápicos industrializados para uso humano são registrados junto à ANVISA, e é através deste registro que o Ministério da Saúde garante a eficácia, segurança, e qualidade do produto, após avaliação de requisitos de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico (BRASIL, 2015a).

A legislação vigente preconiza para a droga vegetal, a confirmação da identidade botânica, sua integridade, e análise das características organolépticas, teor de umidade e cinzas totais, presença de material estranho como contaminantes micros e macroscópicos, incluindo fungos, bactérias e micotoxinas, e metais pesados. O local da coleta, e se foram usados ou não métodos para a eliminação de contaminantes, também devem ser reportados. É ainda necessário, ser apresentada uma análise qualitativa e quantitativa dos marcadores, sendo que o controle quantitativo destes pode ser substituído pelo controle biológico da atividade terapêutica (BRASIL, 2014d; BRASIL, 2015a).

Já para o derivado vegetal e o produto final devem ser informados as partes da planta que foram empregadas, os métodos de extração utilizados, os solventes, excipientes ou veículos utilizados no processo extrativo, a relação aproximada droga vegetal/ derivado vegetal, os ensaios de pureza e integridade, e os testes físico-químicos empregados, além do perfil cromatográfico e quantificação dos marcadores. Para o produto final, o controle de qualidade irá variar de acordo com a forma farmacêutica, mas sempre exigindo em todas, as análises de integridade e estabilidade do produto (BRASIL, 2014d; BRASIL, 2015a).

Além dos critérios mencionados anteriormente, a ANVISA, através da RDC nº 105 de 2016, que incorporou o anexo V à RDC 26 de 2014, e da RDC 235 de 2018

preconiza que a partir do dia 25 de agosto de 2019, deverão ser realizadas análises de resíduos de duzentos e cinquenta agrotóxicos em todas as petições de registro e pós-registro de medicamentos fitoterápicos. As análises deverão ser feitas, tanto para droga vegetal como para o derivado vegetal e o produto final. Apenas os produtos provenientes de uma agricultura orgânica, mediante comprovação, ficam isentos da análise. (BRASIL, 2016b; BRASIL, 2018b).

Em torno de 60% da população do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) utiliza plantas medicinais nos dias atuais. E como muitos pesticidas têm estrutura similar aos metabólitos secundários, esses são facilmente extraídos em conjunto (HEINZEN, 2017). É provável que os motivos citados anteriormente sejam os responsáveis pelos quais nove dos agrotóxicos mais comercializados do país estejam presentes na RDC nº 105 de 2016, que dispõe sobre os agrotóxicos que deverão ser analisados no processo de produção de derivados vegetais (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2016b).

A monografia da *M. glomerata* (BRASIL, 2018a) aponta para alguns ensaios analíticos na avaliação da qualidade da droga vegetal, derivado e produto final. Embora a maioria destes ensaios não esteja especificamente determinados, a monografia aponta alguns dos ensaios que deverão ser realizados de acordo com a literatura ou com os métodos preconizados pela 6ª edição da Farmacopeia Brasileira. No caso da tintura alguns dos ensaios preconizados, não só pela monografia e pela farmacopeia, mas também pela RDC 26/2014, são: análise de caracteres organolépticos, determinação de contaminantes comuns, microbiológicos, de micotoxinas, metais pesados, análises físico-químicas (resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade relativa), e identificação e quantificação de marcadores químicos (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2014c; BRASIL, 2014d; BRASIL, 2018a; BRASIL, 2019a; BRASIL, 2021a).

Alguns estudos já foram realizados avaliando a qualidade de folhas e tinturas de *M. glomerata*. Em trabalho de Osorio (2002), após avaliar o teor de CMR em tinturas comercializadas foi encontrada uma variação de 0,10 mg/ml até 0,72 mg/ml deste marcador, sendo que a tintura padrão deste trabalho apresentava um teor de 1,27 mg/ml. Resultados similares foram obtidos por Alvarenga e colaboradores (2009), avaliando 3 diferentes amostras de tintura, observou-se que todas exibiam odor

aromático próprio, mas possuíam cores e aspectos diferentes. No mesmo estudo, concentrações do marcador químico, CMR, variaram de 0,72% a 0,15%, mostrando a variabilidade com que esse princípio ativo se encontra em produtos comercializados (ALVARENGA et al, 2009).

Alguns autores citam que apesar da 1ª edição do FFFB preconizar o uso da tintura de *M. glomerata* a 20% p/v (BRASIL, 2011), foi constatado concentrações diferentes em algumas tinturas comercializadas na época que este documento era a versão mais atualizada (OSÓRIO, 2002; ALVARENGA et al, 2009). Atualmente, a tintura preconizada na 2ª edição do FFFB, é a de 10% p/v. (BRASIL, 2021a). Essa diferença de concentração pode levar a variações nos efeitos farmacológicos desejados, no entanto não há descrição na literatura do impacto da influência dessas variações na atividade terapêutica. Até o presente momento não há nenhum estudo nacional mostrando a presença de contaminantes inorgânicos ou resíduos de agrotóxicos em amostras de *M. glomerata*.

1.3.1 Agrotóxicos

Com a crescente popularização das plantas medicinais nos últimos vinte anos, através do uso de formulações caseiras, fitoterápicos, produtos farmacêuticos sofisticados ou cosméticos, as preocupações não só com a eficácia, mas também com a segurança desses produtos foram intensificadas (BESIL et al, 2017). No ano de 2016, o Ministério da Saúde brasileiro, com o intuito de garantir a segurança dos medicamentos à base de plantas medicinais em todos os âmbitos possíveis, instituiu a RDC nº 105 com os agrotóxicos que deveriam ter seus resíduos investigados a partir do início de 2018, sendo que esse prazo foi alterado posteriormente, pela RDC 235/2018, para agosto de 2019 (BRASIL, 2016b; BRASIL, 2018b).

O Decreto-lei nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, define agrotóxicos e afins como:

"produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais,

cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento".

Os agrotóxicos ou defensivos agrícolas, também são conhecidos como praguicidas, pesticidas e biocidas (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002), podem ser classificados de acordo com os grupos químicos, o grau toxicológico, pela finalidade a qual se destinam ou pelo modo de ação, conforme demonstrado no quadro 1 (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; WHO, 2007; SESA, 2018).

O Brasil, desde 2008, possui o título de um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT), que é uma plataforma de consulta pública composta por um banco de dados de agrotóxicos registrados no MAPA, e com informações fornecidas pela ANVISA e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no ano de 2017, havia 1.846 produtos comerciais registrados no Brasil, sendo 424 ingredientes ativos (agente químico, físico ou biológico que confere eficácia aos agrotóxicos). Desse total, a classe com o maior número de registro é o de herbicidas (476), seguido pelos inseticidas (398) e fungicidas (383) (BRASIL, 2018c). Entre os anos 2018 a 2021 foram registrados mais 1.978 produtos, superando o número de todos os anos anteriores somados (UFMG, 2021).

No ano de 2014 foi registrada a maior incidência de intoxicação por agrotóxicos no Brasil (6,26 casos por 100 mil habitantes) no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (Sinan). Isso, sem levar em consideração os casos de subnotificação ou de intoxicação por exposição crônica, o que dificulta o diagnóstico. No período de 2007 a 2015, dados do Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, apontaram 84.206 casos de intoxicação por agrotóxicos registrados no país, sendo 1.955 no estado do Rio de Janeiro. Os raticidas foram a classe responsável pela maioria das intoxicações (42,1%), seguido dos agrotóxicos de uso agrícola (36,5%) (BRASIL, 2018c). Dados do Sinan, disponibilizados no TABNET, dos anos de 2016 até maio de 2022, informam a notificação de 68.415 casos de intoxicação por defensivos agrícolas, sendo 2.191

casos no estado Rio de Janeiro. Do total nacional os agrotóxicos agrícolas passaram a ocupar a primeira posição de notificações com 44,1% (BRASIL, 2022b).

Quadro 1: Classificação dos agrotóxicos de acordo com os grupos químicos, o grau toxicológico e pela finalidade a qual se destina.

Tipo de Classificação	Subclassificação	Exemplos
Quanto ao risco à saúde	Classe I: extremamente tóxico	Abamectina, Paraquat, Brometo de metila, Carbendazim.
	Classe II: Altamente tóxico	Clorpirifós, Propoxur
	Classe III: Medianamente tóxico	Acefato, Malationa, lambda-cialotrina, Mancozebe, Tiram.
	Classe IV: Pouco tóxico	Glifosato
Quanto à finalidade	Inseticidas	Abamectina, Acefato, Malationa, Clorpirifós, Propoxur, lambda-cialotrina, Brometo de metila.
	Fungicidas	Carbendazim, Dimetomorfe, Mancozebe, Brometo de metila.
	Herbicidas	Glifosato, Paraquat, Brometo de metila.
	Acaricidas	Abamectina, Acefato, Malationa, Mancozebe.
	Desfolhantes	
	Outros (fumigantes, raticidas, moluscicidas, nematocidas, algicidas)	Clorpirifós, Brometo de metila.
Quanto à estrutura química	Organoclorados	DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin.
	Osganofosforados	Malation, clorpirifós, temefós, acefato, fenitrothion, paration, metamidofós.
	Carbamatos e ditiocarbamatos	Carbofuram, aldicarbe e propoxur; mancozebe e tiram.
	Piretroides	Deltrametrina, cipermetrina, lambda-cialotrina e permetrina.

Fonte (adaptado): PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; WHO, 2007; SESA, 2018.

O grau de intoxicação varia de acordo com o tempo de exposição e com o grau toxicológico de cada substância ativa presente nas formulações dos produtos agrotóxicos (BRITO; GOMIDE; CÂMARA, 2009). No quadro 2 pode-se observar os sintomas da intoxicação dos ativos, por agrupamento químico, mais encontrados em alimentos através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA. Os sintomas apresentados comprometem diversos tecidos ou

sistemas do corpo humano, manifestando-se através de sinais clínicos como vômitos, espasmos musculares e convulsões, em casos de intoxicação aguda, e lesões hepáticas, fibrose muscular, teratogêneses e cânceres, em casos de exposição crônica (BRASIL, 2015c).

Quadro 2: Classificação e efeitos/ou sintomas agudos e crônicos de algumas classes de agrotóxicos.

PRAGA QUE CONTROLA	GRUPO QUÍMICO	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossomiais e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretróides sintéticos	Irritações das conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas, hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatite, doença de Parkinson, cânceres
	Fentalamidas	-	Teratogêneses
Herbicidas	Dinitroferóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres, cloracnes
	Fenoxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres, teratogêneses
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios, conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose muscular

Fonte (adaptado): BRASIL, 2015c.

Com o aumento da demanda por plantas medicinais e seus derivados, e consequentemente de uma produção agrícola mais intensa de ervas, do que a coleta tradicional praticada por séculos, os níveis de investimento e desenvolvimento em técnicas de cultivo para maximizar os lucros também foram elevados (BESIL et al,

2017). Técnicas como o uso de fertilizantes para o desenvolvimento das espécies ou pesticidas para protegê-las contra pragas aumentaram de forma exponencial (WHO, 2007; TRIPATHY et al, 2016).

No Brasil só é permitido o uso de agrotóxico em plantas medicinais se aquele produto estiver registrado especificamente para àquela espécie medicinal. Em nossa atualidade só há registro para plantas medicinais se aquela também for destinada ao uso como alimento, sendo exemplos o gengibre, o alho, a hortelã e etc. O cultivo ideal para plantas medicinais é o orgânico, onde já são estabelecidas as substâncias químicas, biológicas e agrotóxicos registrados como produtos fitossanitários aprovados para o uso em espécies vegetais (BRASIL, 2019b). Nos anexos V, VII e VIII da Portaria nº 52 de 2021, constam as substâncias e produtos, com suas respectivas especificações, que podem ser utilizados como produtos fitossanitários em culturas orgânicas durante e após a colheita (BRASIL, 2021b). Mesmo em culturas orgânicas, os defensivos agrícolas podem alcançar as plantas pela aplicação por pulverização em hortas vizinhas, e do solo contaminado e até mesmo durante a colheita e armazenamento do produto (BESIL et al, 2017).

Malinowska e Jankowski (2015) comprovaram a presença de dois fungicidas (difenilamina e tebuconazol) e um inseticida (clorpirifós) em três ervas medicinais usadas na Polônia. Foi encontrada a presença de clorpirifós em duas das doze amostras de *Cassia angustifolia* utilizadas na medicina tradicional da Índia (TRIPATHY et al, 2016). Amostras comerciais de *Calendula officinalis*, bastante utilizadas em creme e loções, por mulheres em período de amamentação, tiveram as substâncias imidacloprido, metalaxil, pirimifós metílico e atrazine detectadas em análise multi-resíduos de agrotóxico (BESIL et al, 2017). E em algumas outras ervas medicinais, como a Camomila e o Ginseng, de uso bastante comum, também foram encontrados resíduos de pesticidas (ABOU-ARAB; ABOU-DONIA, 2001; DURGNAT et al, 2005). E com um resultado bastante expressivo, Wang e colaboradores (2021) recentemente analisaram 1.017 amostras comerciais de 10 diferentes espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional chinesa. Destas, 113 (13,2%) continham pelo menos um resíduo de agrotóxico e 773 (76%) continham múltiplos resíduos. E das 84 substâncias encontradas, o carbendazim (35,7%) e clorpirifós (32,1%) eram os mais recorrentes (WANG et al, 2021).

No Brasil, em trabalho de Rodrigues e colaboradores (2007), foi empregada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para a detecção de alguns pesticidas em folhas de *Mikania laevigata*, *Maytenus ilicifolia* e *Cordia verbenácea*, de um campo experimental em Paulínia, São Paulo. Dentre os achados, foi detectada a contaminação com 4,4'-DDE e com dieldrin acima dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos na Farmacopeia Européia (RODRIGUES et al, 2007). Outro trabalho já havia demonstrado a presença de resíduos de dieldrin, lindano, tetradifon, malation, clorotalonil e *p*-endosulfan, em seis amostras comerciais de *Passiflora sp.*, de diferentes estados brasileiros, através de análises por CG (ZUIN; YARIWAKE; BICCHI, 2003). Somado a isso, alguns autores brasileiros têm apontado para a possibilidade de produções agrícolas de plantas medicinais estarem contaminadas de forma direta ou indireta por resíduos de agrotóxicos (PIGNAT; MACHADO; CABRAL, 2007; RODRIGUES et al, 2007; FERREIRA et al, 2014).

Das substâncias encontradas, destaca-se a presença do clorpirifós por ser recorrente nos trabalhos, e por ser um inseticida organofosforado de grau toxicológico II, altamente tóxico por via oral, e com 26 produtos registrados no AGROFIT (BRASIL, 2018c; BRASIL, 2021c). É um inibidor da enzima acetilcolinesterase que pode prolongar certos tipos de sinapses nervosas resultando em broncoespasmos, paralisia do músculo estriado, taquicardia, convulsões, depressão respiratória podendo levar ao óbito, ainda mais quando considerado o efeito sinérgico que exerce junto com outros organofosforados e carbamatos (DOW AGROSCIENCES INDUSTRIAL LTDA, 2018). O 4,4'-DDE e o dieldrin são pesticidas organoclorados resultantes da degradação do DDT e do Aldrin, respectivamente. Os efeitos do 4,4'-DDE à saúde humana não são descritos na literatura, mas o DDT e o Aldrin, que já não são mais permitidos no Brasil, apresentam alta lipossolubilidade, assim como o Dieldrin, persistindo no ambiente e no tecido adiposo de animais e humanos, podendo causar convulsões e carcinogênese. Essas substâncias já foram encontradas no sangue humano, no leite materno, no tecido placentário e cordão umbilical (D'MATO, TORRES, MALM, 2002; USA, 2002).

Os riscos à saúde podem ser minimizados ao assegurar que as plantas medicinais e seus derivados contaminados com substâncias potencialmente nocivas não alcancem a população. E isso pode ser realizado com a investigação da qualidade

dessas espécies antes mesmo de alcançarem o mercado (WHO, 2007). As agências reguladoras de medicamentos do Brasil apresentam preocupações quanto a esta questão, e a própria OMS recomenda que estas análises sejam incluídas no processo de registro dos fitoterápicos (WHO, 2007; BRASIL 2016b).

A maioria dos trabalhos presentes na literatura descrevem a validação de métodos para análise de agrotóxicos em plantas medicinais, mas poucos trabalham com produtos acabados ou com a análise da qualidade de amostras comercializadas em seus respectivos países ou estados (QIN et al, 2015; TAHA, GADALLA, 2017). Essa é uma área de estudo pouco explorada e não há até o momento nenhum trabalho nacional analisando a presença de contaminantes inorgânicos ou de resíduos de agrotóxicos em amostras ou derivados de *M. glomerata*.

2. RELEVÂNCIA

Os medicamentos fitoterápicos e seus insumos devem ser caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2019c). Muitos autores vêm discutindo a qualidade das plantas medicinais e da matéria-prima vegetal disponíveis no mercado brasileiro e considerando-a aquém dos padrões exigidos pela legislação vigente (OGAVA et al, 2003; ROCHA; SOARES; CORRÊA, 2004; NASCIMENTO et al, 2005; MELO et al, 2007; GUIMARÃES et al, 2007; ALVARENGA et al, 2009; GINDRI; LAPORTA; SANTOS, 2012; LEAL-COSTA et al; 2018; LOPES et al, 2019). Em trabalho de Silva e colaboradores (2006), esse problema já havia sido apontado no Programa Farmácia Viva de Maracanau (CE), onde não era possível observar o controle de qualidade dos medicamentos manipulados, principalmente por não haver padrões de referência disponíveis para efetuar as análises, admitindo a necessidade de estudos para garantia da qualidade, eficácia e segurança dos fitoterápicos desenvolvidos e sugerindo uma parceria com a rede pública, institutos e universidades locais para resolver este problema.

A *M. glomerata* vem sendo utilizada pela população e por empresas privadas e públicas, sendo que a Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, através das Farmácias Vivas, faz a distribuição da espécie em estudo para uso terapêutico complementar em forma de tintura e xarope sendo largamente utilizado no tratamento de doenças respiratórias como: bronquite, asma, tosse, gripes e resfriados, devido as suas propriedades como expectorante, broncodilatador, anti-inflamatório e antipirético.

Os fitoterápicos podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química, por isso a transformação de uma planta em um medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada (TOLEDO et al, 2003). Somando isso ao fato de que tem sido cada vez mais comum a adulteração intencional da matéria-prima vegetal, através da substituição da espécie por outra não farmacopeica, devido à dificuldade de obtenção da mesma, ou apenas por outra espécie apresentar um valor econômico

inferior, fica clara a necessidade da padronização desses medicamentos (BRASIL, 2018a).

Diante desses fatos, atualmente, essa padronização é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no derivado vegetal ou produto final, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004). No caso da *M. glomerata*, este possui um marcador químico que está relacionado à atividade farmacológica da CMR, no entanto, na monografia farmacopeica não constam descrições de limites estabelecidos que padronizem sua eficácia terapêutica. Alguns limites podem ser sugeridos, de acordo com o que já foi observado na literatura, mas não há até o momento uma relação entre limite mínimo do marcador químico e sua eficácia.

Desta forma, atendendo as RDCs nº 26 de 05/2014 e 105 de 09/2016, é importante avaliar as condições que se encontram os derivados vegetais a base de *M. glomerata* comercializados no Estado do Rio de Janeiro, com o uso de análises já preconizadas pela Farmacopeia Brasileira e associadas a ensaios farmacológicos de atividade. Visto que este é um dos fitoterápicos mais comercializados no Brasil e por empresas privadas, sendo o que possui o maior número de licenças pela ANVISA, e também é distribuído pelo programa de Farmácias Vivas do Estado do Rio de Janeiro, dentro do Programa de Práticas Integrativas e Complementares (AMORIN, 2015; CARVALHO, 2018).

3. OBJETIVO

Avaliar a qualidade de tinturas a base de *Mikania glomerata*, comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, utilizando ensaios preconizados em sua monografia, seguindo critérios da RDC 26/2014 e RDC 105/2016, associados a ensaios de atividade farmacológica.

3.1 Objetivos específicos

- Preparar uma tintura a base de *Mikania glomerata* a fim de obter um padrão para utilização nos estudos;
- Analisar o marcador químico cumarina nas amostras de tintura adquiridas no comércio;
- Desenvolver e validar método multirresíduo para determinação quantitativa de resíduos de agrotóxico na matriz tintura de *Mikania glomerata*;
- Analisar resíduos de agrotóxico utilizando o método validado nas amostras de tintura adquiridos no comércio;
- Analisar as características organolépticas, o resíduo seco e a contagem total de microrganismos nas amostras de tintura adquiridos no comércio;
- Avaliar a ação farmacológica das tinturas obtidas no comércio no modelo inflamatório de pleurisia alérgica com ovalbumina, observando-se os parâmetros de celularidade;
- Avaliar a ação farmacológica das tinturas obtidas em modelo *in vitro*, observando-se o parâmetro de produção do mediador inflamatório óxido nítrico;
- Analisar de forma comparativa os resultados dos ensaios farmacológicos associados à quantificação dos marcadores químicos;

4. METODOLOGIA

4.1 Droga vegetal e amostras de tintura

Foi empregada como droga vegetal padrão as folhas da espécie *M. glomerata* coletadas no Horto da prefeitura de Volta Redonda. Uma exsicata, nº 2048 foi depositada no herbário VOLRE do Centro Universitário Geraldo Di Biase, também em Volta Redonda. Foram adquiridos 3 lotes de 5 diferentes tinturas a base de *M. glomerata* comercializadas em farmácias magistrais no estado do Rio de Janeiro para a realização dos ensaios comparativos. Este estudo está registrado junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número de cadastro: A9C7710.

4.2 Preparo do derivado vegetal

Em colaboração com o Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da Universidade Federal Fluminense (LNTP-UFF), as folhas de *M. glomerata* foram submetidas à secagem por 48 h em estufa a 50° C, com ventilação forçada, e em seguida trituradas em liquidificador. A tintura a 10% p/v foi obtida por maceração convencional a frio da droga vegetal com etanol 70% v/v, por 14 dias, conforme instruções da sua monografia específica e do FFFB (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2021a). A tintura foi armazenada em frascos de vidro âmbar em temperatura ambiente, enquanto os frascos destinados a pesquisa de agrotóxico foram submetidos a temperatura de 2 a 8° C.

4.3 Análise de rótulo

Para os 3 lotes de 5 Marcas diferentes de tinturas a base de *M. glomerata* adquiridas comercialmente, no estado do Rio de Janeiro, foram avaliados conforme o preconizado pelas RDC 67/2007 (Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias), RDC 71/2009 (Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos) e RDC 18/2013 (Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficiais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde) (BRASIL, 2007; BRASIL, 2009b; BRASIL, 2013).

4.4 Caracterização organoléptica

As amostras de tinturas foram analisadas quanto à cor, aspecto, odor e amargor, a partir dos parâmetros descritos pela Farmacopeia Brasileira. A avaliação da cor e do aspecto dos líquidos foi executada por comparação da solução sob análise preparada conforme instruções na monografia (TR). As amostras foram transferidas para tubos de ensaio de vidro transparente e uniformes, utilizado volumes de 5 mL. Os tubos foram observados longitudinalmente contra fundo branco, sob luz difusa em temperatura de 25 °C (BRASIL, 2019d).

As amostras foram transferidas para recipiente de vidro e inaladas devagar e repetidamente. A intensidade do odor foi classificada segundo as características: nenhum, fraco, distinto ou forte; e, a seguir, em relação à sensação causada pelo odor: aromático ou característico, frutado, mofado ou rançoso. Quanto ao sabor, foi levado à boca 10 mL da solução e passada de um lado para o outro por baixo da língua durante 30 segundos. Logo em seguida ao desprezo das amostras, foi feito um enxague bucal com água potável e aguardado de 10 minutos para testar a solução subsequente. As amostras foram analisadas por um único avaliador (BRASIL, 2019d).

4.5 Determinação do resíduo seco

Em uma balança analítica (EDUTECH/EEQ9003F-B) foi pesado, rapidamente e com exatidão, 2 mL de tintura, em duplicada, em beakers de 20 mL previamente tarados. Evaporou-se todo o solvente em banho de água e secou-se em estufa (Thermo Scientific/Heratherm OMH100) a 105 °C durante 2 horas. Após o resfriamento em dessecador com a presença de sílica gel azul, o peso foi anotado e retornado à estufa por mais 30 min. Esse procedimento foi repetido até se obter peso constante nas últimas 3 pesagens. O resultado foi expresso em mg/mL e em porcentagem das médias (BRASIL, 2010a, BRASIL, 2019d).

4.6 Investigação microbiológica.

Observando os limites farmacopeicos para o produto acabado tintura, foi realizada a contagem total de bactérias aeróbias e de fungos/leveduras, assim como a investigação da presença de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, utilizando as metodologias descritas na Farmacopeia Brasileira 6ª ed (2019d).

Realizando uma diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), 1 mL das amostras foi diluído em 9 mL de caldo caseína. Utilizando o método de semeadura em profundidade, 1 mL de cada diluição foi colocado no fundo de uma placa de Petri e cobertos com 15 mL do Ágar Triptona de Soja (TSA), para determinação do número de bactérias aeróbicas. As diluições 10^{-1} e 10^{-2} também foram semeadas por profundidade utilizando 15 mL do Ágar Sabouraud-dextrose (SAB), para a determinação de fungos e leveduras. Após solidificação do ágar, que até o momento da semeadura estavam sendo mantidos de 45 a 50° C em banho-maria, as placas foram vertidas e incubadas (TSA por 5 dias a 32,5° C e SAB por 7 dias a 22,5° C) (BRASIL, 2019d).

Para a pesquisa de inibidor microbiano, 1 mL da amostra diluída em caldo caseína, na diluição 10^{-1} , foi colocado em novo tubo contendo 8 mL de caldo caseína e 1 mL de solução de referência de *Salmonella sp.* ou *E. coli*. As amostras enriquecidas com os patógenos, assim como as amostras em diluição seriada, foram incubadas por 24 h a 32,5° C (BRASIL, 2019d).

Por fim, para a investigação da presença de patógenos específicos, após 24h de incubação do caldo caseína contendo a amostra 10^{-1} , uma alíquota de 1 mL foi adicionada à 100 mL de caldo MacConkey e outra alíquota de 0,1 mL adicionada à 10 mL do caldo Rappaport. Ambos foram incubados a 32,5° C por 24 h e 48 h, respectivamente (BRASIL, 2019d).

4.7 Caracterização Fitoquímica

Para a caracterização fitoquímica das tinturas, foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrofotometria de Ultravioleta (CLAE-UV/VIS), partindo de metodologia já validada para a espécie em estudo (AGUIAR, 2014). Os espectros de varredura de absorção molecular na região do UV/VIS foram obtidos com auxílio de detector com arranjos de diodos (DAD) a 280 nm. As amostras foram injetadas em triplicata, e o padrão de CMR (Sigma – Aldrich: 72609) foi utilizado nas análises comparativas e na curva analítica (a faixa de trabalho utilizada foi de 2,41 a 14,46 µg/mL).

Condições cromatográficas do método: coluna LiChorosorb RP-select B; fase móvel composta por metanol e ácido trifluoracético 0,05 % v/v; temperatura 50° C;

fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção de 30 µL. A tabela 1 mostra o gradiente de solventes utilizado.

Tabela 1: Gradiente utilizado no método de identificação da cumarina na matriz tintura de Guaco.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Bomba A (Metanol grau CLAE)</i>	<i>Bomba B (TFA 0,05 % v/v)</i>
<i>0 (início)</i>	5 %	95 %
<i>0 a 45</i>	95 %	5 %
<i>45 a 50</i>	5 %	95 %
<i>50 a 60</i>	5 %	95 %

Fonte: Acervo pessoal, 2021.

4.7.1 Equipamentos utilizados

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos SPD-M10A, forno CTO-20A, bomba LC-10AD e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp®.
- Balança analítica, fabricante Mettler Toledo, AX 205.
- Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore, modelo A-10.
- Aparelho de ultrassom, fabricante Branson, modelo 3210.

4.7.2 Insumos utilizados

- Água grau CLAE (0,22 µm) (Milli-Q-Millipore)
- Metanol grau PA, fabricante Merck
- Ácido trifluoracético (TFA) grau PA, fabricante Merck
- Coluna LiChorosorb RP-select B octadecilsilano (C18) 5 µm, (250 mm x 4,0 mm diâmetro), fabricante Merck lote OB 310598
- Padrão de Cumarina (Sigma-Aldrich 72609)

4.8 Cultivo Celular

As células utilizadas nesse trabalho foram as linhagens de macrófagos murinos J774A.1 e pulmonares AMJ2-C11 (BCRJ – código 0121 e 0039, respectivamente), obtidas do cultivo em meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich: D5648-1L)

suplementado com 10% de soro fetal bovino [SFB (Sigma-Aldrich: F9665)] e 1% de penicilina e estreptomicina e anfotericina B (Gibico: 0550). Foram utilizadas também, as células primárias extraídas da medula de camundongos Swiss e cultivadas em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich:R6504), suplementado com 18% de meio condicionado, 10% SFB, 1% de glutamina (Sigma-Aldrich: 59202c) e 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B. As células foram mantidas em estufa (Sanyo Scientific/ COM-17AC) com 5% de CO₂ a 37° C.

4.8.1 – Extração de células primárias

Camundongos Swiss Webster foram eutanasiados, submergidos em álcool 70% e transportados para o fluxo laminar previamente esterilizado com a luz UV. Ambos os membros inferiores foram removidos com o auxílio de material cirúrgico estéril e armazenados em tubo contendo RPMI. A remoção total dos tecidos muscular e conjuntivo ocorreu em seguida, deixando apenas os ossos (pés e fíbula foram descartados). A tíbia e o fêmur foram separados na altura da rótula do joelho e um pequeno corte foi realizado em todas as epífises para expor as medulas. Utilizando uma seringa de 5 mL e uma agulha 22G, prosseguiu-se com o *flush* utilizando 10 mL total de RPMI suplementado conforme as especificações do item 4.8. Após a extração das células, elas foram armazenadas em placas de 4 poços (10 mL por poço). No 4^o dia após a extração, mais 10 mL de meio suplementado foram adicionados à placa. No 8^o dia após a extração, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados 2 vezes com PBS gelado e raspados para centrifugação e contagem de células.

4.9 Análise da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, células das linhagens J774A.1 e AMJ2-C11, foram centrifugadas por 8 min a 33570 g e ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer e ajuste de suspensão para 1x10⁵ cél/mL. Em microplaca de 96 poços as células foram incubadas (100 µL/poço) com 100 µL da tintura referência (TR) e das tinturas comerciais (TCs), em quadruplicata, em diferentes concentrações, por 24 horas em estufa. Após esse período 22 µL de MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide – Invitrogen: M6494) foram adicionados em cada poço, e a placa foi novamente incubada em estufa por um período de 4 horas (SILVA, 2009). A intensidade da absorbância foi mensurada em leitor de microplaca

SpectraMax®M5/ Molecular Devices a 550 nm, com valores processados pelo programa SoftMax Pro 5.3.

4.10 Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico *in vitro*

Células das linhagens J774A.1 e AMJ2-C11, e cultura de células primárias extraídas da medula de camundongos (Swiss Webster), diferenciadas em macrófagos, foram plaqueadas em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^5$ cél/poço), e tratadas com a TR e com as TCs 1 hora antes do estímulo com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$ – Sigma-Aldrich O55:B5). O microtubo com LPS, após ser descongelado, foi submetido ao sonicador (Unique - 1400) por 1 h antes de ser diluído. Após 24 h de incubação em estufa, 50 μL dos sobrenadantes foram coletados para a avaliação da produção de NO. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de macrófagos não tratados e não estimulados, e como controle positivo o sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS e não tratados. A dosagem do NO foi realizada indiretamente através da quantificação de nitrito, um metabólito estável do NO, sendo este determinado pelo método colorimétrico de Griess (GREEN, 1982; PARK et al 2018). A curva do nitrito foi preparada em 5 pontos de concentração (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μM) mais o branco. Foram adicionados 50 μL do reagente de Griess em cada amostra e nos 5 pontos da curva, e após 15 min, a absorbância foi mensurada a 540 nm em leitor de microplaca SpectraMax®M5/ Molecular Devices. Os valores foram processados pelo programa SoftMax Pro 5.3.

4.11 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c e Swiss, com tempo de vida de 5 a 6 semanas, e peso médio variando entre 20 a 25 g, oriundos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Os animais foram mantidos sob condição constante de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$), em ciclo claro/escuro de 12 h, e com fornecimento de água e comida *ad libitum*.

Os animais foram aclimatados por uma semana antes dos experimentos no Serviço de Animais de Laboratório do INCQS. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob a licença LW-7/19.

4.12 Pleurisia alérgica induzida por ovalbumina

Camundongos Balb/C foram imunizados por via subcutânea dorsal nos dias 0 e 7, com 200 μ L de uma solução contendo 50 μ g de ovalbumina (OVA) adsorvida em 5 mg de hidróxido de alumínio. No 13^o dia, os animais sensibilizados foram colocados na situação de jejum por 10 h antes de receber os tratamentos. No 14^o dia, os animais foram tratados com a tintura de referência (TR) e com as tinturas comerciais (TCs) em diferentes concentrações por via oral 1 hora antes do estímulo intratorácico com OVA (50 μ g em 100 μ L de água para injetável). Para avaliação da pleurisia, os animais foram eutanasiados 24 horas após o estímulo e suas cavidades torácicas foram lavadas com 1 mL de PBS (pH 7,4). A contagem de leucócitos totais foi realizada através de câmara de Neubauer com diluição de 1:20 da amostra em corante de Turk, e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de citoesfregaços (centrífuga ALB 12 CC – INBRAS – 605 rpm/5 min), corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa (Kit Panótico rápido – Laborclin), utilizando microscópio Nikon Eclipse E100 (x40) para ambas as contagens (AGRA et al, 2016; MUYLAERT, 2018).

4.13 Análise estatística dos ensaios farmacológicos.

Os resultados dos ensaios farmacológicos foram apresentados como média \pm erro padrão da média, e foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Newman-Keuls-Student, considerando significativo os valores de $p \leq 0,05$. Caso seja necessário, será utilizado o teste “t” de Student para realizar a comparação entre os grupos controle e tratado. A ferramenta empregada para fins estatísticos em todos os testes foi o software GraphPad Prism 5.01 em sistema operacional Windows 10.

4.14 Estudo de resíduo de agrotóxicos

Para a análise de resíduo de agrotóxico na matriz tintura de *M. glomerata*, primeiramente foi realizada a validação do método analítico para posterior análise das amostras comerciais. Utilizou-se o método de injeção direta, descrita por Dias e colaboradores (2019), 500 μ L da TR foram diluídos em 500 μ L de metanol com acetonitrila (ACN) 1:1 v/v. Após, a tintura diluída foi filtrada com filtro de politetrafluoretileno de 0,22 μ m em *vial* para análise cromatográfica. (DIAS; et al, 2019)

Conforme metodologia desenvolvida pelo Setor de Resíduo de Agrotóxico do INCQS/FIOCRUZ (BASTOS et al, 2013; QUINTÃO, 2021), 330 ingredientes ativos (IAs), utilizados como agrotóxicos, foram investigados por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massa sequencial (CLUE-MS/MS). E para validação do método, foi utilizado como referência o guia da comunidade europeia SANTE para a área de resíduos de agrotóxicos (SANTE, 2020). Após, foi verificado quais dos IAs validados estão presentes na "Lista de agrotóxicos selecionados para análise", descritos no anexo V da RDC 105/2016, assim como os limites máximos permitidos pela Farmacopeia Brasileira em drogas vegetais (BRASIL, 2016b).

4.14.1 Equipamentos utilizados

- Balança analítica, fabricante Metter Toledo, modelo AG:245.
- Sistema de purificação de água, fabricante Merck Milipore, modelo Milli-Q.
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência, fabricante Waters, modelo ACQUITY UPLC. Equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador e forno para a coluna.
- Detector espectrômetro de massas sequencial, fabricante Waters, modelo Quattro Premier XE equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Z-Spray) e estação de trabalho MassLynx™ Versão 4.1

4.14.2 Insumos utilizados

- Água grau CLAE (0,22 µm) (Milli-Q-Millipore).
- Metanol grau CLAE, fabricante Merck.
- Acetonitrila grau CLAE, fabricante Merck.
- Ácido fórmico grau CLAE, fabricante Merck.
- Formato de amônio grau de análise, fabricante Fluka.
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 com 1,7 µm de tamanho de partícula esférica, 2,1 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento, fabricante Waters, modelo ACQUITY UPLC BEH.
- Pré-coluna C18 com 1,7 µm de tamanho de partícula esférica, fabricante Waters, modelo VanGuard BEH.

4.14.3 Análises por CLUE-EM-/EM

As fases utilizadas na etapa de eluição cromatográfica, denominadas solução A1 e B1, são compostas, respectivamente, de 5 nmol/L de formato de amônio, 1% de ácido fórmico, 10% de metanol em água deionizada, e metanol em grau cromatográfico. Foram utilizadas também, duas fases móveis de limpeza de sistema, identificadas como A2 e B2, compostas por 5% e 25% de metanol, respectivamente. As fases móveis foram filtradas e degaseificadas antes da inserção no sistema cromatográfico. As amostras processadas por CLUE-EM/EM seguiram um gradiente de eluição inicial de 82,5% de A1 com rampa linear até 5,5% da mesma fase em curva linear (Tabela 2). A corrida analítica durou 25 min com um fluxo de 0,3 mL/min.

Tabela 2: Gradiente de eluição empregado na coluna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C18.

Tempo (min)	A1 (%)	B1 (%)
0	82,5	17,5
17	5,5	94,5
20	5,5	94,5
25	82,5	17,5

Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Os demais parâmetros das condições de análise utilizadas na validação do método analítico para a matriz tintura de *M. glomerata*, podem ser encontrados no quadro 3. O IA propoxur (0,02 µg/mL) foi utilizado como controlador do sistema descrito abaixo. O processamento dos dados foi realizado usando o método padronizado pelo setor de resíduos de agrotóxico do INCQS (UPLC_Agrotóxicos_2020_positivo).

Quadro 3: Condições CLUE-EM/EM para validação do método analítico.

CLUE	
Coluna analítica ACQUITY UPLC™	BEH C ₁₈ , 1,7 µm, 100 x 2,1 mm
Pré - coluna VanGuard™	BEH C ₁₈ , 1,7 µm
Temperatura da coluna	35°C
Vazão da Fase Móvel	0,3 mL/min
Volume de injeção	5 µL
Fase móvel A1	5 mmol/L formato de amônio em água (10% metanol) + 0,1% ácido fórmico
Fase móvel B1	Metanol
Método	UPLC_Agrotóxicos_2020
EM/ EM	
Fonte	ES ⁺
Voltagem do capilar	0,98 kV
Temperatura da fonte	100°C
Tipo de interface	Electrospray (Z-Spray™)
Fluxo do gás do cone	50L/h de Nitrogênio
Temperatura de dessolvatação	400°C
Gás de dessolvatação/ fluxo	Nitrogênio ultra puro/ 800 L/h
Gás de colisão/ pressão	Argônio/ 3,5 x 10 ⁻³ mbar
Método	UPLC_Agrotóxicos_2020_positivo

Fonte: QUINTÃO, 2021.

4.14.4 Validação

Foi utilizado como base para a validação deste trabalho o guia da comunidade europeia SANTE para a área de resíduos de agrotóxicos (SANTE, 2020).

4.14.4.1 Seletividade e efeito matriz

As folhas utilizadas no preparo da TR desse estudo são provenientes de um horto orgânico. Desse modo, a validação do método foi realizada utilizando a TR em estudo como o branco da matriz. Então, a fim de descartar resultados do tipo falso positivo, a seletividade do método foi realizada com a TR (sem a presença dos analitos de interesse), verificando a ocorrência de qualquer interferência na região de eluição

dos analitos de interesse. E para que não houvesse efeito matriz, a curva analítica do estudo foi feita na própria matriz orgânica da TR, e não em solvente. De tal forma que pode – se garantir que o viés resultante da interação dos IAs com as substâncias químicas presentes nessa matriz complexa, seja contabilizado na validação do método.

4.14.4.2 Faixa de trabalho e linearidade

Os 5 pontos utilizados na curva analítica foram provenientes de 5 soluções estoque preparadas com o mesmo material de referência certificado (diluído em metanol), com as mesmas concentrações de todos os IAs avaliados. Na tabela 3 encontram-se os valores dessas soluções, indicando a faixa de trabalho de 0,01 µg/mL a 0,05 µg/mL.

Tabela 3: Soluções usadas no preparo da curva analítica

Ponto	Solução	Concentração (µg/mL)
1	2218-I	0,0100
2	2219-I	0,0200
3	2220-I	0,0300
4	2221-I	0,0400
5	2216-I	0,0500

Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Para o cálculo de regressão da curva analítica foi utilizado o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários conforme a fórmula a seguir:

$$y = bx + a$$

Onde:

y = variável dependente que corresponde à resposta medida

x = variável independente que corresponde à concentração do analito contida nas amostras fortificadas

a = coeficiente linear

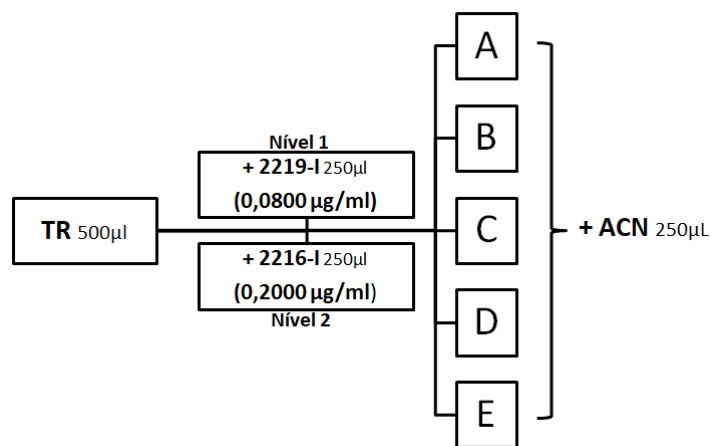
b = coeficiente angular

Na regressão, a homogeneidade da variância (homocedasticidade) dos resíduos foi verificada pelo método de Cochran. A presença de valores aberrantes no conjunto de injeções da curva analítica foi avaliada pelo Teste de Grubbs para valores suspeitos. A significância da regressão foi avaliada pelo método de ANOVA aplicando o pós-teste F-Snedecor. Os coeficientes de correlação e de determinação ($r \geq 0,98$ e $R^2 \geq 0,95$, respectivamente) foram usados como um indício de confirmação da linearidade (MARTINS, 2020; QUINTÃO, 2021). Todos os testes estatísticos mencionados anteriormente foram realizados em planilhas do software Excel® desenvolvidas pelo Laboratório de Resíduos de Agrotóxico (INCQS/FIOCRUZ) exclusivamente para a validação de métodos analíticos.

4.14.4.3 Precisão / Repetibilidade e Exatidão / Taxa de recuperação

Para avaliar a precisão e exatidão do método, a TR (500 μ L) foi fortificada com 250 μ L das soluções 2219-I (Nível 1 = 0,0800 μ g/mL) ou 2216-I (Nível 2 = 0,2000 μ g/mL). Um total de 5 replicatas para cada nível foram feitas, e após a diluição com 250 μ L de ACN (figura 5), cada uma foi injetada duas vezes no UPLC-MS/MS.

Figura 5: Ilustração do método de fortificação.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

A concentração dos IAs presentes na TR fortificada, foram calculados de acordo com a equação a seguir:

$$[\text{extrato}] = [2219\text{-I ou } 2216\text{-I}] \times V_{2219\text{-I ou } 2216\text{-I}} / (V_{\text{final}} \times 4)$$

Onde,

[extrato] = Concentração no extrato final ($\mu\text{g/mL}$)

[2219-I ou 2216-I] = Concentração da solução 2219-I ou 2216-I ($\mu\text{g/mL}$)

$V_{2219\text{-I ou } 2216\text{-I}}$ = Volume adicionado da solução 2219-I ou 2216-I no extrato (mL)

V_{final} = Volume final do extrato orgânico (500 μl de TR + 250 μl de $V_{2219\text{-I ou } 2216\text{-I}}$ + 250 μl de ACN = 1 mL)

4: Fator de diluição da TR com metanol e ACN

A concentração dos IAs na amostra ($\mu\text{g/mL}$) foi calculada de acordo com a equação:

$$[\text{amostra}] = [2219\text{-I ou } 2216\text{-I}] \times V_{2219\text{-I ou } 2216\text{-I}} / 2$$

Onde,

[amostra]: Concentração na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

2: Fator de diluição da TC com propoxur (em metanol) + ACN

Para avaliar a precisão, foi calculado o coeficiente de variação (CV) de acordo com os valores obtidos nas 5 replicatas de cada nível. Em consonância com a comunidade europeia SANTE (2020), o valor máximo aceito foi de 20%.

Para avaliar a exatidão, foi calculada a média das recuperações (Rec) obtidas nas 5 replicatas de cada nível. Em consonância com a comunidade europeia SANTE (2020), os valores aceitos foram os presentes na faixa entre 70 e 120%.

4.14.4.4 Implementação do método validado em amostras comerciais

Após a etapa de validação, o método multirresíduo por CLUE-MS/MS foi utilizado no processamento de 15 amostras de tinturas de Guaco comerciais adquiridas em 5 diferentes bairros do RJ. O preparo das amostras foi realizado conforme descrito no primeiro parágrafo do item 4.14, sendo que uma solução com o IA propoxur (0,02 $\mu\text{g/mL}$), foi utilizado como *surrogate*. O *surrogate* é uma substância com concentração conhecida utilizada para fortificar as amostras no processo da análise, garantindo

assim, que os analitos que não tenham sido encontrados nas amostras após a corrida cromatográfica, de fato não estão presentes. Isso acaba descartando os resultados do tipo falso negativo uma vez que os parâmetros analíticos do *surrogate* estão dentro do validado no método.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de rótulo de tinturas comerciais de Guaco 10%.

As TCs foram adquiridas no Estado do RJ, solicitadas como “tintura de Guaco 10%”, sem a necessidade de uma receita médica, e identificadas de acordo com o bairro de origem, da seguinte forma: Tintura comercial Tijuca (TCT), Tintura comercial Barra da Tijuca (TCB), Tintura comercial Flamengo (TCF), Tintura comercial Ilha do Governador (TCI) e Tintura comercial Gávea (TCG). Os lotes 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) foram avaliados quanto aos parâmetros descritos nas RDCs 67/2007, 71/2009 e 18/2013.

Como pode ser observado na tabela 4, apenas a TCT indica a concentração de preparo da tintura (10%), e a TCG é a única que identifica a espécie botânica de origem, mas com divergência na descrição entre L1 e L2 (*M. glomerata*) e o L3 (*Guaiacum officinale*). Quanto aos componentes da formulação, há a descrição do veículo de extração em apenas 3 das tinturas (TCT, TCI e TCG), sendo que enquanto 2 delas foram extraídas com álcool 70%, a TCT parece ter sido preparada com água destilada. Além disso, a TCG apresentou lotes com concentrações diferentes de álcool (70% - L1 e L3 e 65% - L2).

Apenas a TCI possuía informações de posologia, no entanto a dose sugerida no L1 (20 gts em 200 mL, 2x ao dia) era diferente das sugeridas no L2 e L3 (30 a 40 gts em água ao dia). Nenhuma das TCs oferecem informações sobre armazenamento e conservação. E por fim, a TCT descreveu o produto para uso tópico (L1) e externo (L2 e L3), a TCB para uso externo (L1 e L2) e interno (L3), e TCG descreveu para uso interno (tabela 4).

Tabela 4: Análise de rótulo de três lotes de tinturas de Guaco 10% comercializadas em diferentes bairros do estado do Rio de Janeiro, segundo critérios das RDCs 67/2007, 71/2009 e 18/2013.

Parâmetros/amostras	TCT	TCB	TCF	TCI	TCG
Identificação do produto	TINT GUACO 10 %	TINT GUACO	GUACO TM	GUACO TM	(GUACO) TM
Nomenclatura botânica	—	—	—	—	L1 e L2 - <i>Mikania glomerata</i> L3 - <i>Guaiacum officinale</i>
Componentes da formulação com respectivas quantidades	Água destilada q.s.p.	—	—	Álcool 70%	L1 e L3 - 70% álcool L2 - 65% álcool
Número de registro da formulação no livro de registro	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Nome do prescritor	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Data da preparação	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Prazo de validade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Número do lote	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Número de unidades ou volume	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Posologia	“Use conforme orientação médica”	“Use conforme orientação médica”	“Use conforme orientação médica”	L1 - 20 gts em 200mL, 2x ao dia L2 e L3 - 30 a 40 gts em água ao dia	—
Identificação do estabelecimento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Nome do responsável técnico com respectivo número do Conselho Regional de Farmácia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
CNPJ	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Endereço completo do estabelecimento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Informações de conservação	—	—	—	—	—
Informações adicionais	L1 - Uso tópico L2 e L3 - uso interno	L1 e L2 - Uso externo L3 - uso interno	Veículo alcoólico	—	Uso interno

Legenda: n.a. - não se aplica, gts – gotas.

5.2 Caracterização organoléptica em tinturas de Guaco referência e comerciais

A avaliação das características organolépticas é um dos primeiros parâmetros para detectar diferença entre amostras e um possível desvio de qualidade. Por tanto, 4 parâmetros foram analisados nas tinturas, sendo eles o aspecto, a cor, o odor e o sabor. A TR apresentou uma cor verde escura, sendo o que o L1 com aspecto translúcido e o L2, opaco. O odor é forte e característico da espécie, e o sabor é amargo e ardente (Tabela 5).

Na figura 6 é possível identificar que todas as amostras comerciais apresentaram aspecto translúcido, e as amostras comerciais TCF, TCI e TCG, apresentam a cor predominante sendo a verde. A TCI teve a cor mais próxima à da TR-L1, e a TCF e TCG tiveram variações nos tons de verde (verde claro e verde amarelado, respectivamente). Já a TCB apresentou cor marrom avermelhada e a TCT laranja em tom bem claro. As TCT e TCI apresentaram diferenças nos tons do L1 para o L2 e L3 (Figura 6).

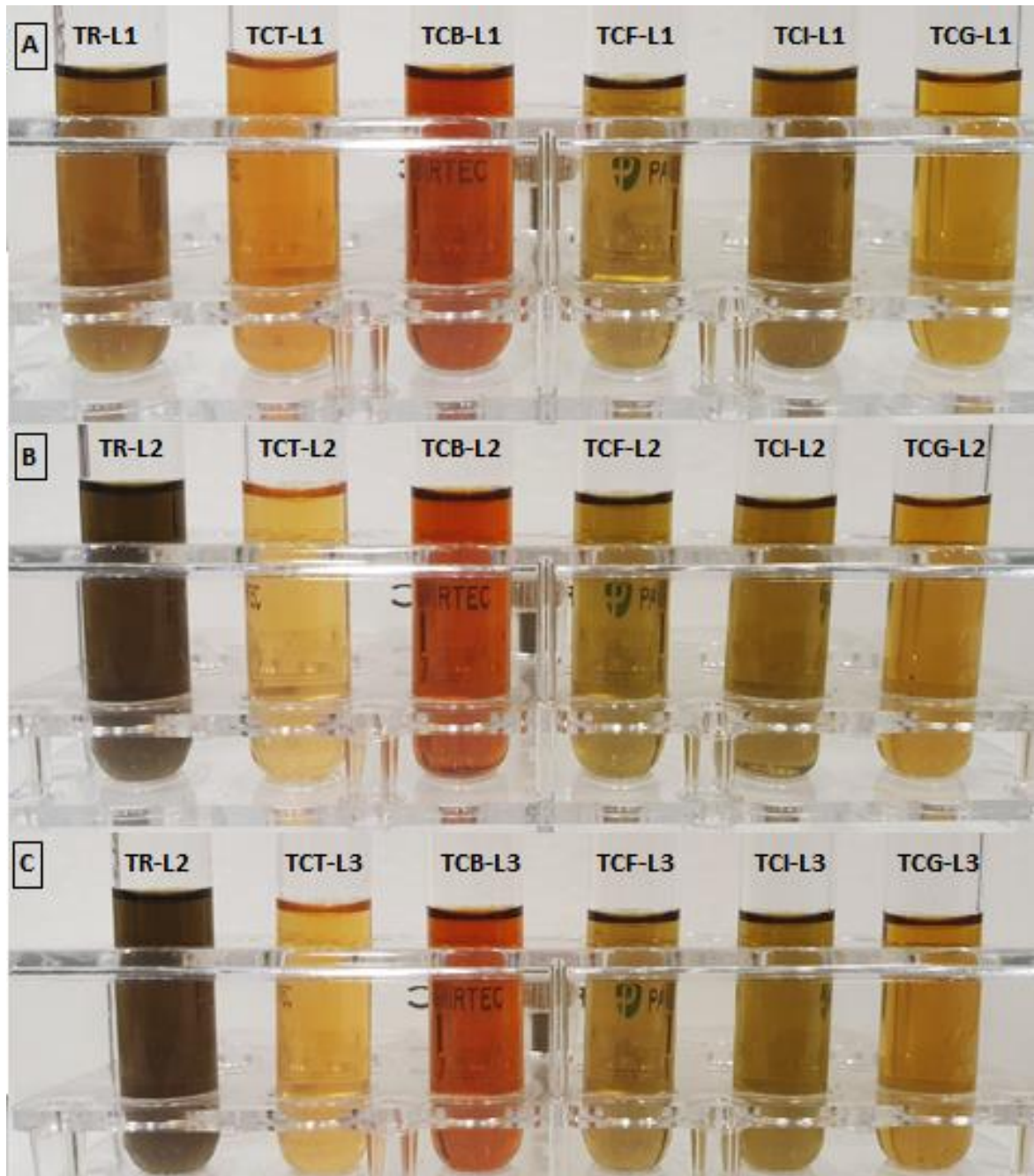
Quanto aos outros parâmetros, a TCF, a TCI e a TCG foram semelhantes a TR por apresentarem odor característico forte e sabor amargo e ardente. Novamente as TCT e TCB destoaram do que foi visto para a TR. A TCB possui odor fraco e um sabor adocicado, e a TCT apresenta ambos os parâmetros muito suaves, quase imperceptíveis. (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação das características organolépticas da tintura de Guaco referência e amostras comerciais.

Amostras		Aspecto	Cor	Odor	Sabor
TR	L1	Translúcido		Forte e característico	Amargo e ardente
	L2	Opaco	Verde escuro		
TCT	L1			Fraco	Muito Suave
	L2 e L3	Translúcido	Laranja		
TCB	L1			Fraco	Adocicado
	L2 e L3	Translúcido	Marrom avermelhada		
TCF	L1, L2 e L3	Translúcido	Verde claro	Forte e característico	Amargo (<TR) e ardente
TCI	L1, L2 e L3	Translúcido	Verde escuro (<TR-L2)	Forte e característico	Amargo e ardente
TCG	L1, L2 e L3	Translúcido	Verde amarelado	Forte e característico	Amargo e ardente

Legenda: TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3.

Figura 6: Avaliação da cor das tinturas de Guaco de referência e das amostras comerciais.



Legenda: TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3. A – Amostras do L1, B – Amostras do L2, C – Amostras do L3. TR-L2 foi utilizada como controle nas análises das TCs L2 e L3.

5.3 Determinação do resíduo seco em tinturas de Guaco referência e comerciais.

A fim de verificar se as TCs teriam valores aproximados do resíduo seco da TR, extraído de acordo com o preconizado na 2ª edição do FFFB para a tintura de *M. glomerada*, e assim aferir a similaridade e qualidade dos processos extrativos, foi determinado o resíduo seco através de evaporação seguida de secagem conforme o descrito na farmacopeia. Os valores analisados de cada amostra estão apresentados em mg/ml e percentual do resíduo seco, conforme a tabela 6.

A TR apresentou 15,28 mg/mL (L1) e 17,93 mg/mL (L2) de resíduo em sua composição (tabela 6). Valores próximos foram observados na TCI (16,53, 13,96 e 14,45 mg/mL) e TCG (14,55, 14,18 e 15,25 mg/mL) em todos os lotes. A TCF resultou em resíduos com valores um pouco mais baixos (11,43, 13,85 e 12,03 mg/mL), seguida pela TCB (9, 8,95 e 9,83 mg/mL). Por último, a TCT apresentou o valor de resíduo seco mais destoante do valor da TR, com 1,43, 1,05, e 2,03 mg/mL no L1, L2 e L3, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6: Determinação do resíduo seco em tintura de Guaco referência e amostras comerciais, seguindo as metodologias farmacopeicas de evaporação e secagem.

Amostra		Média (g)	Resíduo seco (mg/mL)	Resíduo seco (%)
TR	L1	0,0306	15,28 ± 0,001	1,53 ± 0,07
	L2	0,0359	17,93 ± 0,0002	1,79 ± 0,01
TCT	L1	0,0029	1,43 ± 0,0007	0,14 ± 0,003
	L2	0,0021	1,05 ± 0,0001	0,11 ± 0,007
	L3	0,0041	2,03 ± 0,0007	0,20 ± 0,003
TCB	L1	0,018	9 ± 0,001	0,90 ± 0,07
	L2	0,0179	8,95 ± 0,0007	0,89 ± 0,03
	L3	0,0197	9,83 ± 0,0003	0,98 ± 0,01
TCF	L1	0,0229	11,43 ± 0,001	1,14 ± 0,05
	L2	0,0277	13,85 ± 0,0009	1,38 ± 0,04
	L3	0,0241	12,03 ± 0,0004	1,20 ± 0,02
TCI	L1	0,0331	16,53 ± 0,001	1,65 ± 0,06
	L2	0,0279	13,96 ± 0,0006	1,39 ± 0,03
	L3	0,0289	14,45 ± 0,0008	1,45 ± 0,04
TCG	L1	0,0291	14,55 ± 0,0005	1,46 ± 0,02
	L2	0,0284	14,18 ± 0,0007	1,42 ± 0,003
	L3	0,0305	15,25 ± 0,0004	1,53 ± 0,02

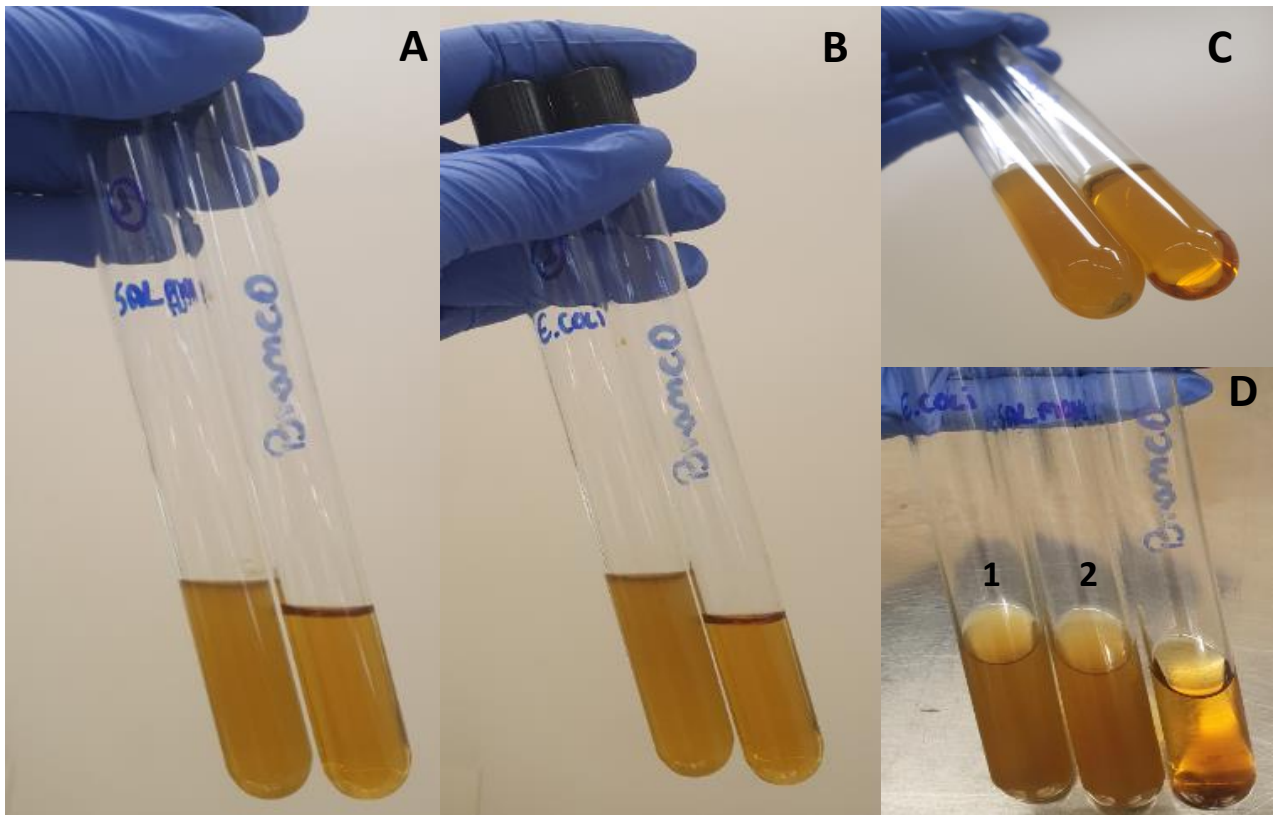
Legenda: TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3. Ensaio realizado em duplicata. ± Representa o desvio padrão das médias.

5.4 Investigação microbiológica em tinturas de Guaco referência e comerciais.

A verificação da capacidade inibitória das amostras ocorreu com a inoculação de 1% dos microrganismos de referência (*E. coli* e *Salmonella sp.*) no caldo caseína contendo 1% das amostras. A presença do crescimento bacteriano na TR, caracterizada pela turbidez que não é vista no grupo controle branco (Figura 7), indicou a ausência de substâncias inibidoras, permitindo assim, a continuação das análises. O mesmo foi observado em todas as TCs (Tabela 7).

Por seguinte, os meios de cultura TSA, SAB, MacConkey e Rappaport, foram utilizados para a investigação de bactérias aeróbicas, fungos e leveduras, *E. coli* e *Salmonella sp.*, respectivamente, tanto na TR quanto nas TCs. Não houve crescimento de colônias nas placas TSA e SAB para todas as amostras testadas (Tabela 7). Quanto à pesquisa específica de patógeno para a forma farmacêutica tintura, os caldos MacConkey e Rappaport não apresentaram turbidez característica de crescimento microbiológico em nenhuma das amostras. Caracterizando assim, a ausência de *E. coli* e *Salmonella sp.* (Tabela 7). Os resultados da TR e das TCs foram satisfatórios e as amostras foram consideradas aprovadas do ponto de vista legislativo (BRASIL, 2019d).

Figura 7: Avaliação da capacidade inibitória da Tintura de Referência de Guaco frente à inoculação de *E. coli* e *Salmonella sp.*



Legenda: A – Caldo caseína contendo a TR inoculada com *Salmonella sp.*; B - Caldo caseína contendo a TR inoculada com *E. coli*; C – Precipitado de micro-organismos no caldo com a TR (tubo a esquerda); D - Caldo caseína contendo a TR inoculada com *E. coli* (1) e *Salmonella sp.* (2).

Tabela 7: Avaliação microbiológica da tintura de Guaco referência e amostras comerciais, seguindo as metodologias farmacopeicas.

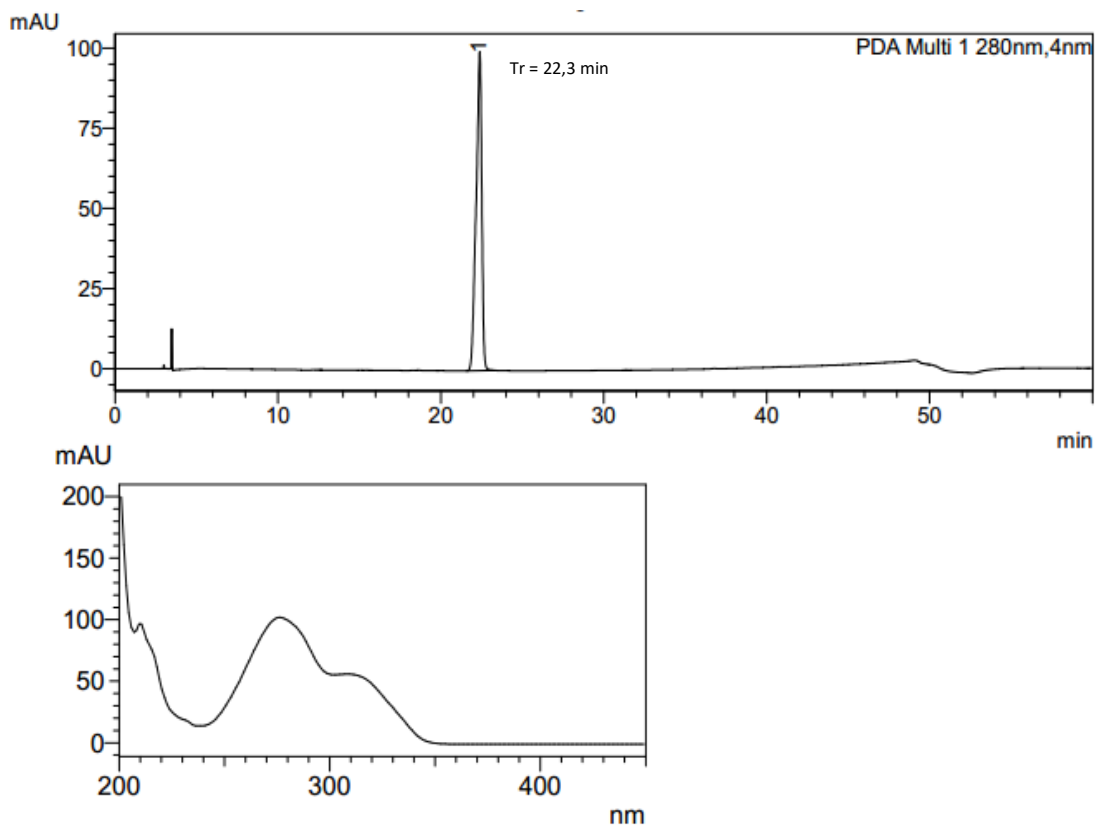
Amostra		Inibidor microbiológico	Bactérias mesofílicas (UFC/mL)	Fungos e Leveduras (UFC/mL)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	Desfecho
TR	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
TCT	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L3	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
TCB	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L3	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
TCF	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L3	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
TCI	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L3	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
TCG	L1	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L2	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.
	L3	A	N.C.	N.C.	A	A	A.S.

Legenda: TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3, A – Ausente; N.C. – Não houve crescimento; A.S. – Amostra satisfatória.

5.5 Identificação da cumarina em tinturas de Guaco por CLAE-UV-DAD

Um padrão de CMR foi preparado (em etanol para CLAE) e injetado. A figura 8 mostra o cromatograma obtido com um sinal significativo no tempo de retenção (Tr) de 22,3 min aproximadamente. O perfil do espectro de varredura molecular na região UV foi extraído, onde foi observado 3 pontos de máximos (218, 278 e 309 nm) e 2 pontos de mínimos (242 e 304 nm) de absorção molecular que caracteriza as transições eletrônicas específicas da CMR. Entretanto, para maior confiabilidade foi utilizado os pontos acima de 225 nm, pois pontos abaixo de 200 nm não possuem boa repetibilidade. Deve-se considerar para efeitos de comparações de espectros o erro permitido para o detector UV (± 3 nm)

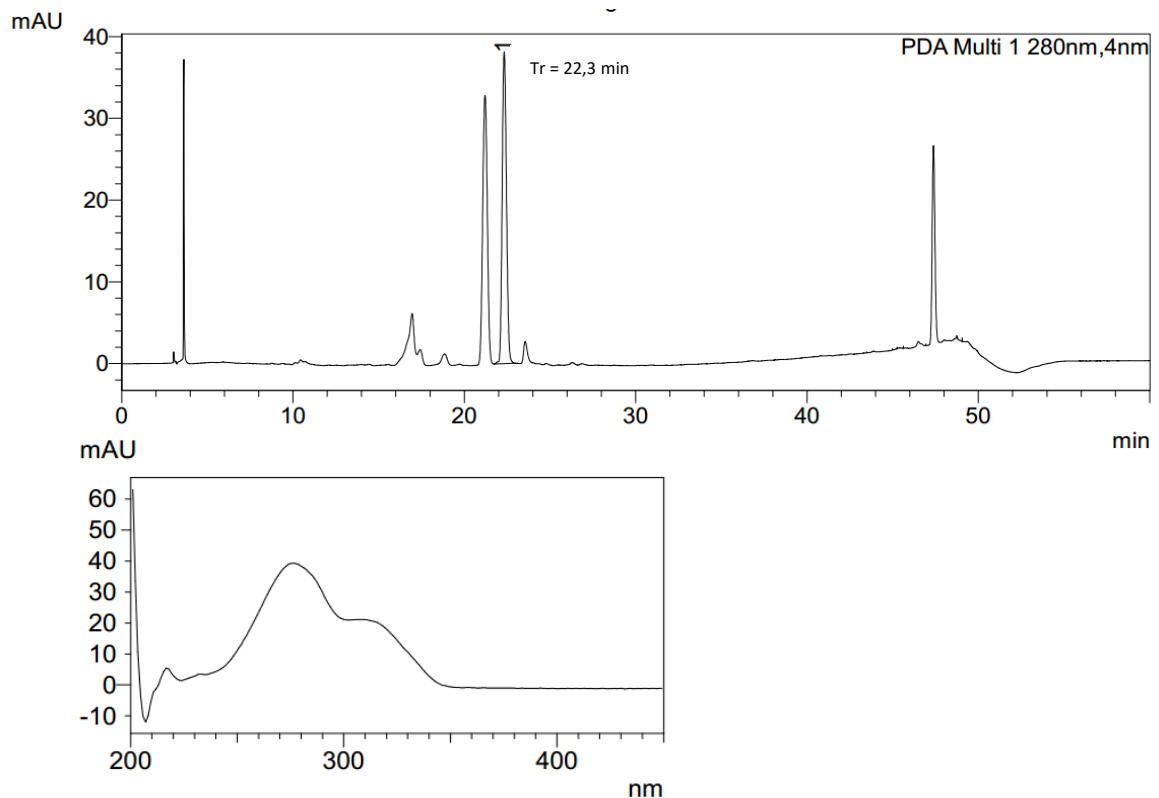
Figura 8: Cromatograma do padrão de cumarina e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.



Legenda: Cromatograma (imagem superior), da CMR padrão ($Tr \cong 22,3$ min), e seu espectro (imagem inferior) no $Tr \cong 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

A amostra TR-L2 (Figura 9) apresentou um sinal (Tr 22,3 min) no mesmo tempo de retenção quando comparado ao cromatograma da CMR padrão (Tr 22,3 min) e o espectro de absorção molecular foi similar ao da CMR padrão, portanto, a presença de CMR na amostra foi confirmada.

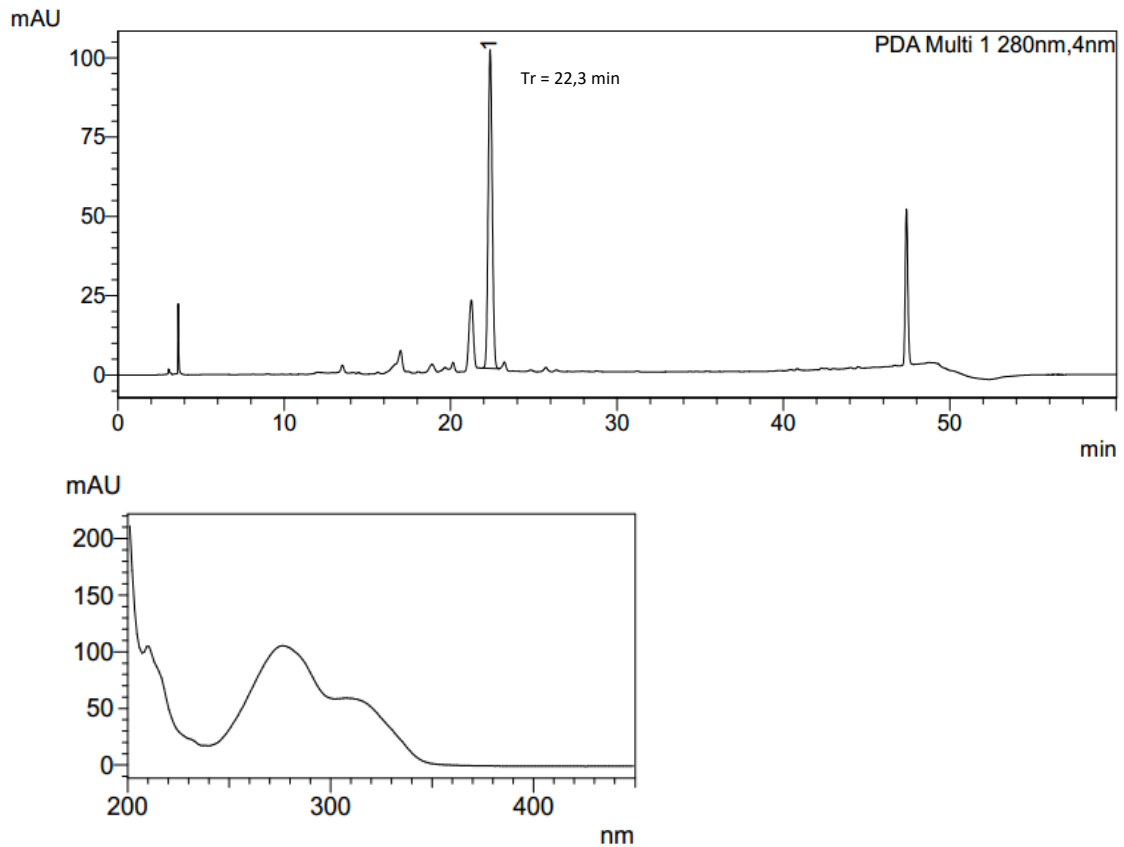
Figura 9: Cromatograma da Tintura Guaco Referência e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TR 10%, e o espectro (imagem inferior) da CMR no $Tr \approx 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

A amostra TCF (Figura 10) apresentou um sinal (Tr 22,3 min) próximo ao tempo de retenção quando comparado ao cromatograma da CMR padrão (Tr 22,3 min) e o espectro de absorção molecular também foi similar ao do padrão.

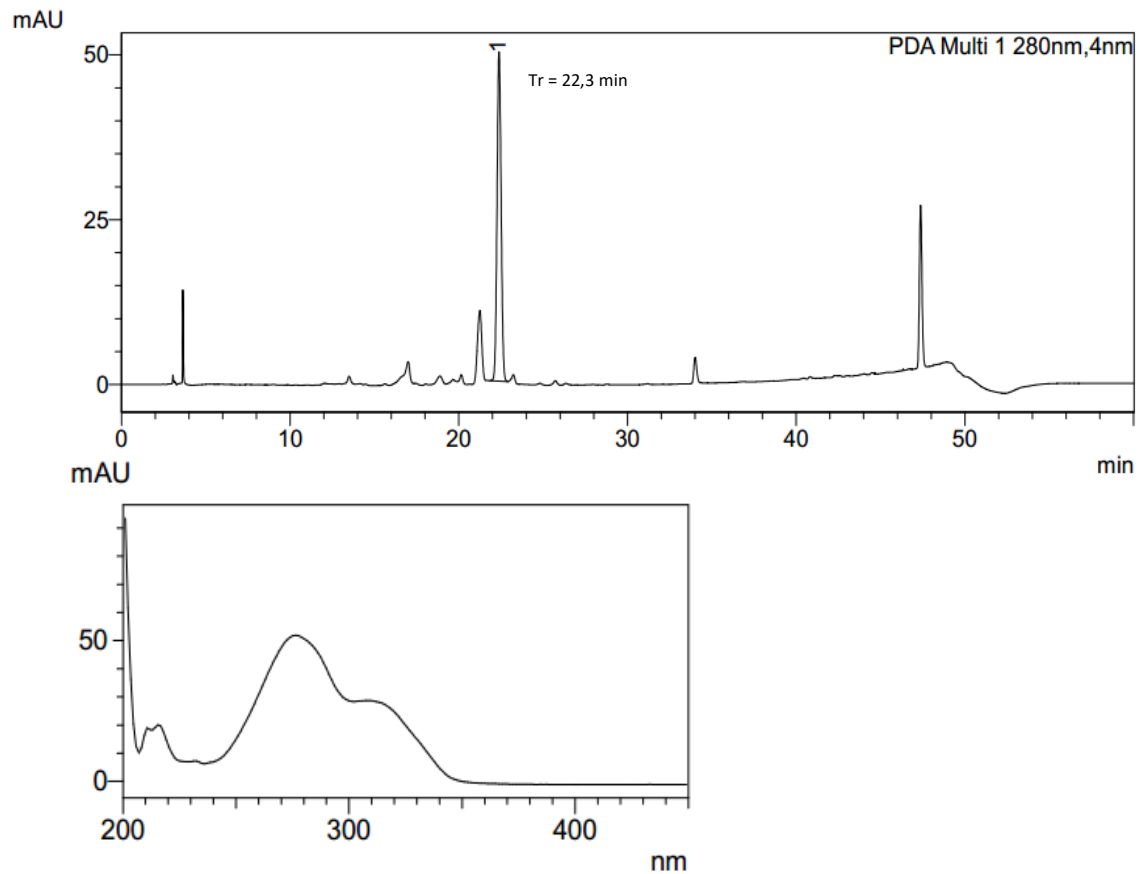
Figura 10: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Flamengo e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TCF, e o espectro (imagem inferior) da CMR no $Tr \cong 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

A amostra TCI (Figura 11) apresentou um sinal (Tr 22,3 min) próximo ao tempo de retenção quando comparado ao cromatograma da CMR padrão (Tr 22,3 min) e o espectro de absorção molecular também foi similar ao padrão.

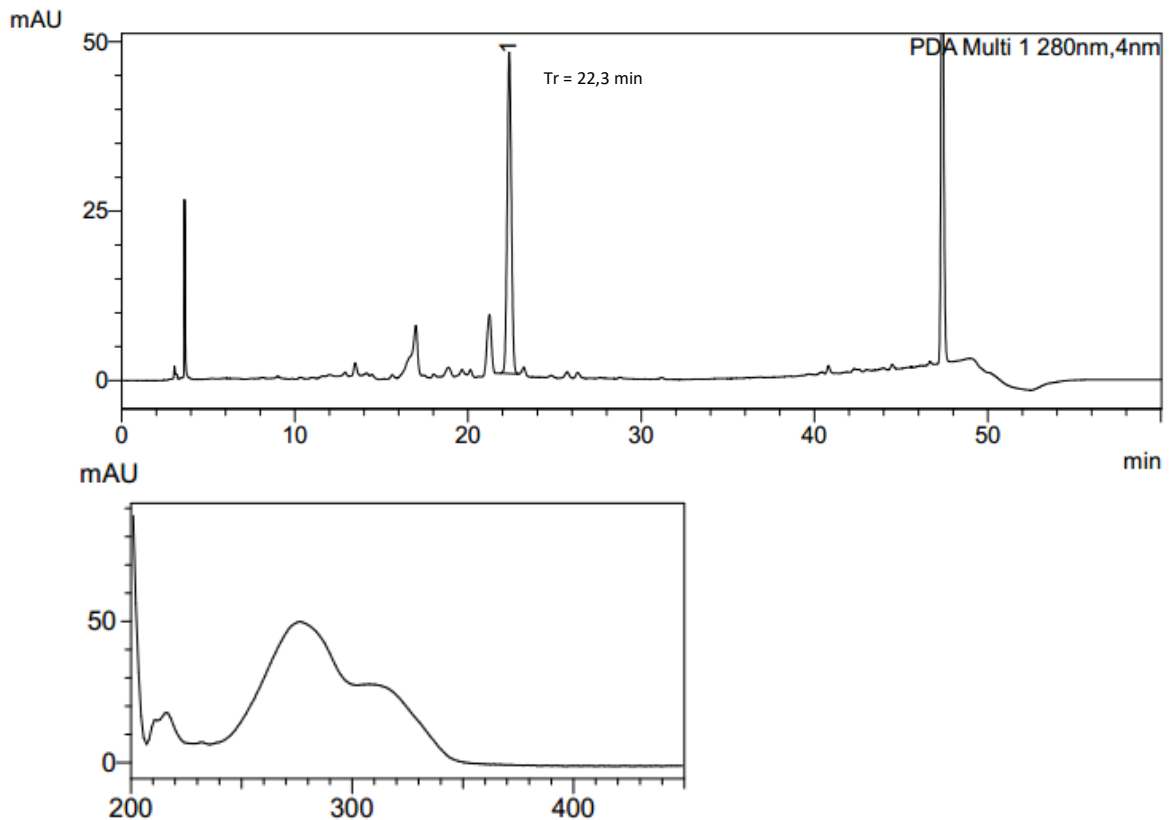
Figura 11: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Ilha e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TCI, e o espectro (imagem inferior) da cumarina no $Tr \cong 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

A amostra TCG (Figura 12) apresentou um sinal (Tr 22,3 min) próximo ao tempo de retenção quando comparado ao cromatograma da CMR padrão (Tr 22,3 min) e o espectro de absorção molecular também foi similar ao do padrão.

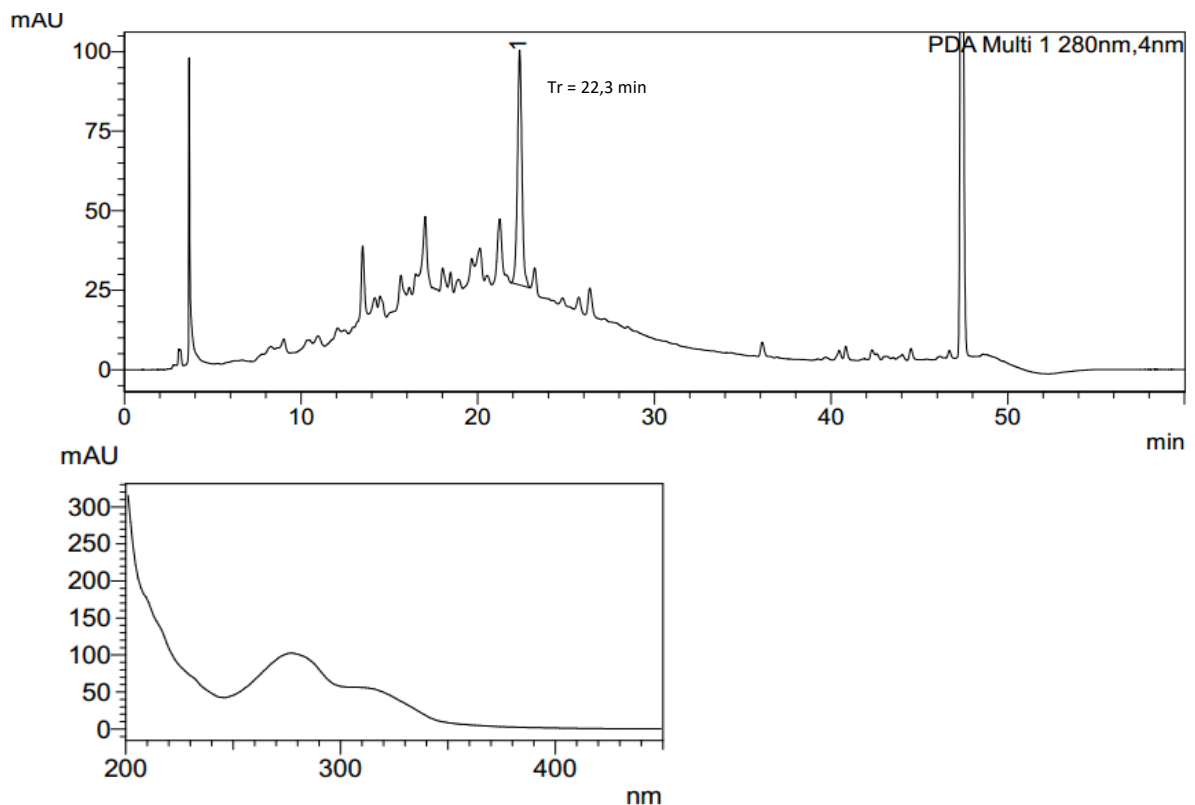
Figura 12: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Gávea e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TCG, e o espectro (imagem inferior) da CMR no $Tr \cong 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

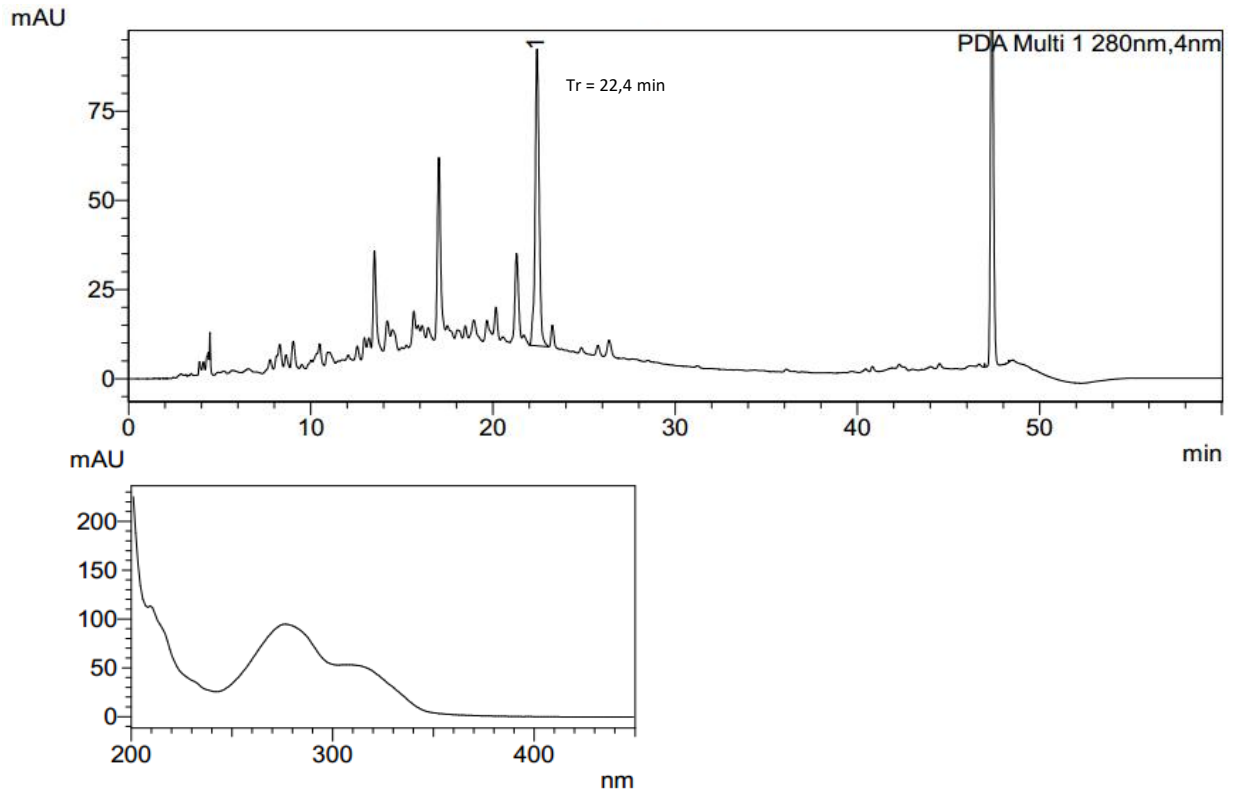
As amostras TCB (Figura 13) e TCT (Figura 14) apresentaram um sinal baixo (Tr 22,3 e 22,4 min, respectivamente) próximo ao tempo de retenção do padrão de CMR (Tr 22,3 min). Ambos os espectros de absorção molecular apresentaram pouca similaridade ao da CMR padrão.

Figura 13: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Barra e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TCB, e o espectro (imagem inferior) da CMR no $Tr \cong 22,3$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

Figura 14: Cromatograma da Tintura Guaco Comercial Tijuca, e o espectro UV no tempo de retenção da cumarina.



Legenda: Cromatograma (imagem superior) do perfil químico da amostra TCT, e o espectro UV (imagem inferior) no $Tr \cong 22,4$ min, analisados por CLAE-UV-DAD.

5.6 Quantificação da cumarina em tinturas de Guaco por CLAE-UV-DAD

Após a confirmação da presença de CMR em todas as amostras, foi feita a quantificação da mesma utilizando uma curva analítica de CMR (diluída em etanol para CLAE) na faixa de 2,48 a 14,88 $\mu\text{g/mL}$, com 4 pontos de intervalo, sendo utilizada a área do sinal obtido em 280 nm. Na tabela 8, pode-se observar com base no resultado da equação da reta encontrada, a concentração média de 369,35 $\mu\text{g/mL}$ de CMR na TR-L2. Esta foi utilizada nos ensaios comparativos das TCS-L2 e L3.

A TCF-L2 foi a amostra com o valor de CMR (273,14 $\mu\text{g/mL}$) mais próximo da TR-L2. Valores acima ao de referência foram encontrados na TCI-L3, TCI-L2 e TCF-L2 com 484,02, 492,24 e 507,69 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A TCG apresentou valores mais baixos tanto no L2 (227,16 $\mu\text{g/mL}$) quanto no L3 (224,26 $\mu\text{g/mL}$). As amostras TCT e TCB foram as cujo valor de CMR mais destoou da TR-L2. A TCB apresentou 38, 59 e 38,29 $\mu\text{g/mL}$ (L2 e L3, respectivamente) e a TCT apresentou 7,51 e 9,18 $\mu\text{g/mL}$ (L2 e L3, respectivamente) de CMR (Tabela 8).

Tabela 8: Concentração de cumarina, em tinturas de Guaco comercial, calculada através da curva analítica (área).

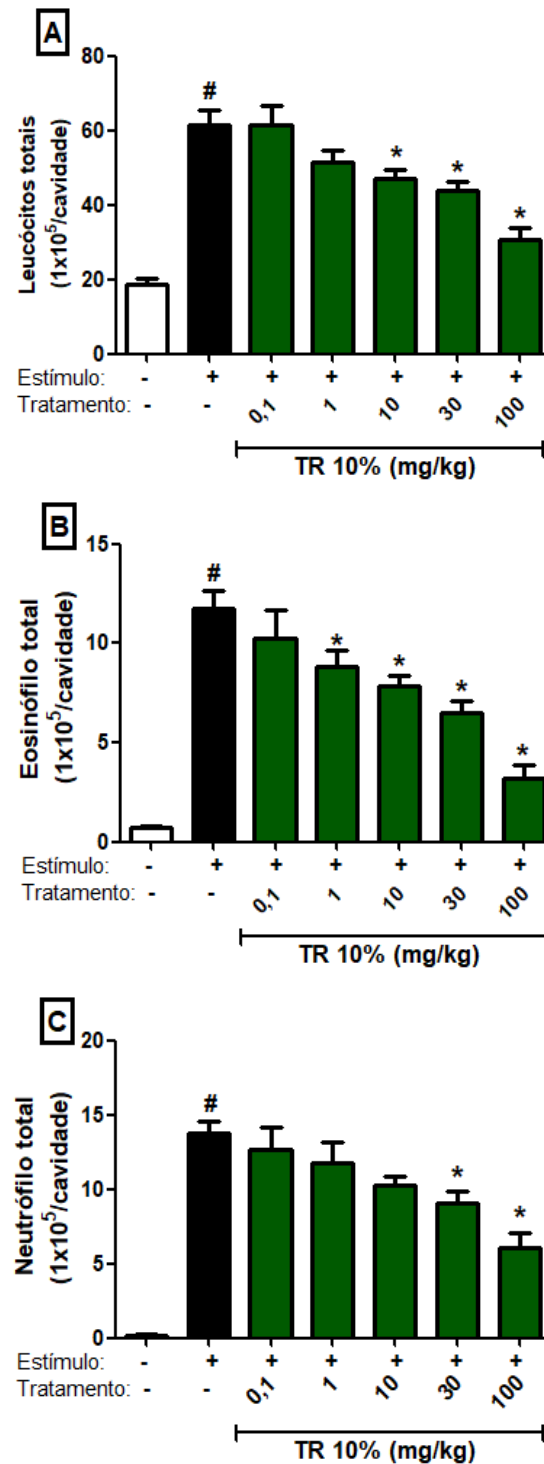
Amostras	Tr	Concentração	Concentração	Concentração	
	(min)	final ($\mu\text{g/mL}$) *	final (mg/mL) *	final (mg/g) #	
TR	L2	22,33	369,35	0,369	3,69
TCT	L2	22,42	7,51	0,007	0,07
	L3	22,40	9,18	0,009	0,09
TCB	L2	22,37	38,59	0,038	0,38
	L3	22,37	38,29	0,038	0,38
TCF	L2	22,38	507,69	0,507	5,07
	L3	22,39	273,14	0,223	2,23
TCI	L2	22,38	484,02	0,484	4,84
	L3	22,39	492,24	0,492	4,92
TCG	L2	22,38	227,16	0,227	2,27
	L3	22,38	224,26	0,224	2,24

Legenda: Ensaio realizado em triplicata. Tr – Tempo de Retenção, TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3. * Resultados expressos em μg ou mg/mL de tintura. # Resultados expressos em mg/g de folha seca.

5.7 Efeito *in vivo* das tinturas de Guaco referência na pleurisia induzida por OVA

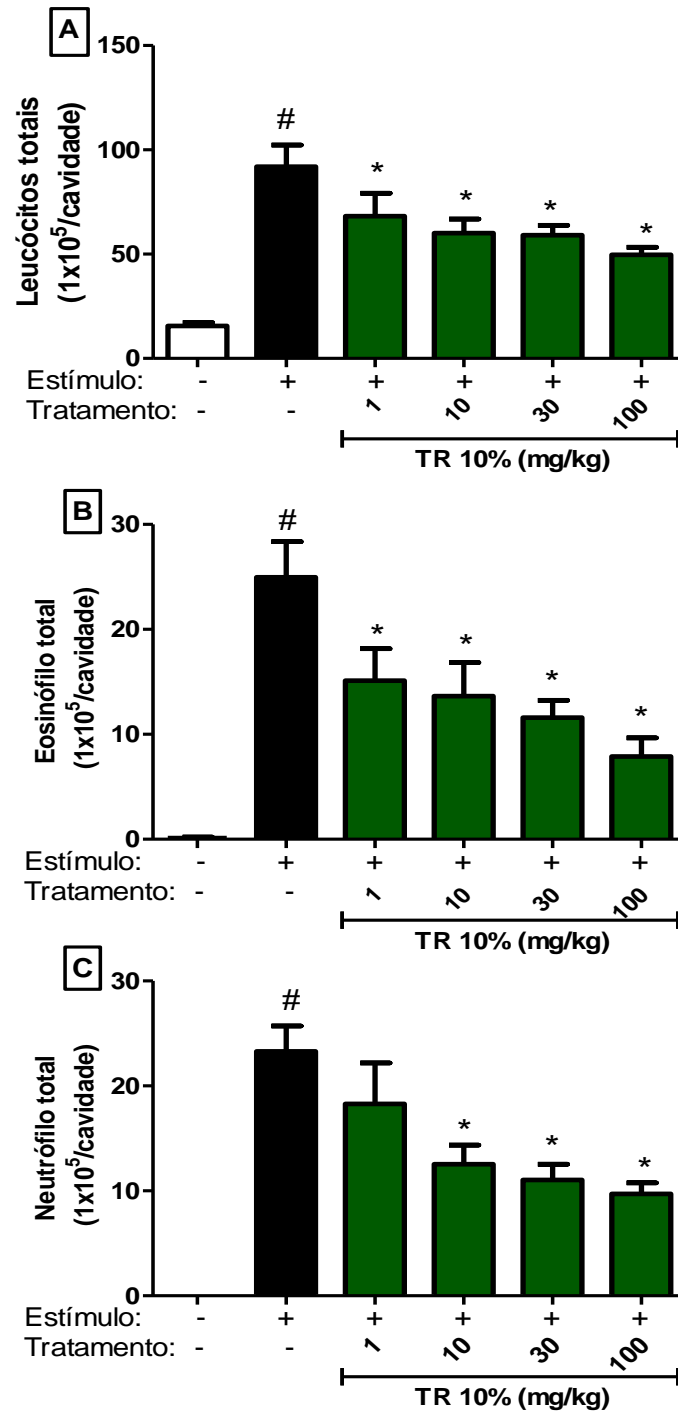
Para iniciar os ensaios de atividade farmacológica, investigando qual o modelo experimental poderia ser utilizado como método de controle de qualidade das amostras comerciais, foi induzida uma pleurisia alérgica com OVA (50 µg/mL) em camundongos previamente tratados apenas com TR-L1 em diferentes doses (0,1, 1, 10, 30 e 100 mg/kg), determinadas a partir do peso do resíduo seco. Após 24 h, foi observado um aumento significativo de leucócitos totais, eosinófilos e neutrófilos no grupo estimulado e não tratado (OVA) quando comparado ao grupo não estimulado (salina) (Figura 15). Pode-se observar na figura 18, que as doses de 10, 30 e 100 mg/kg foram capazes de reduzir de forma significativa o infiltrado leucocitário total, em comparação ao grupo OVA. Essas mesmas doses, além da de 1 mg/kg, tiveram efeito inibitório também na população de eosinófilos (Figura 15B). Quanto aos neutrófilos (Figura 15C), apenas as duas maiores doses reduziram sua expressão no infiltrado pleural. Já na TR-L2, a dose de 1 mg/kg também foi capaz de reduzir significativamente o infiltrado leucocitário total e os eosinófilos (Figura 16A-B) quando comparado ao grupo que foi apenas estimulado com OVA. E a partir da dose de 10 mg/kg ocorreu a redução da população de neutrófilos (Figura 16C).

Figura 15: Efeito *in vivo* da tintura de Guaco referência (L1) na pleurisia alérgica.



Legenda: Efeito *in vivo* da TR-L1 de *M. glomerata* (0,1, 1, 10, 30 e 100 mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais (A) e populações de eosinófilos (B) e neutrófilos (C) na cavidade pleural de camundongos Balb/C (n=18) estimulados com OVA (50 μ g/por animal). Camundongos foram tratados 1h antes do desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (OVA) e não estimulado (Salina); * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado.

Figura 16: Efeito *in vivo* da tintura de Guaco referência (L2) na pleurisia alérgica

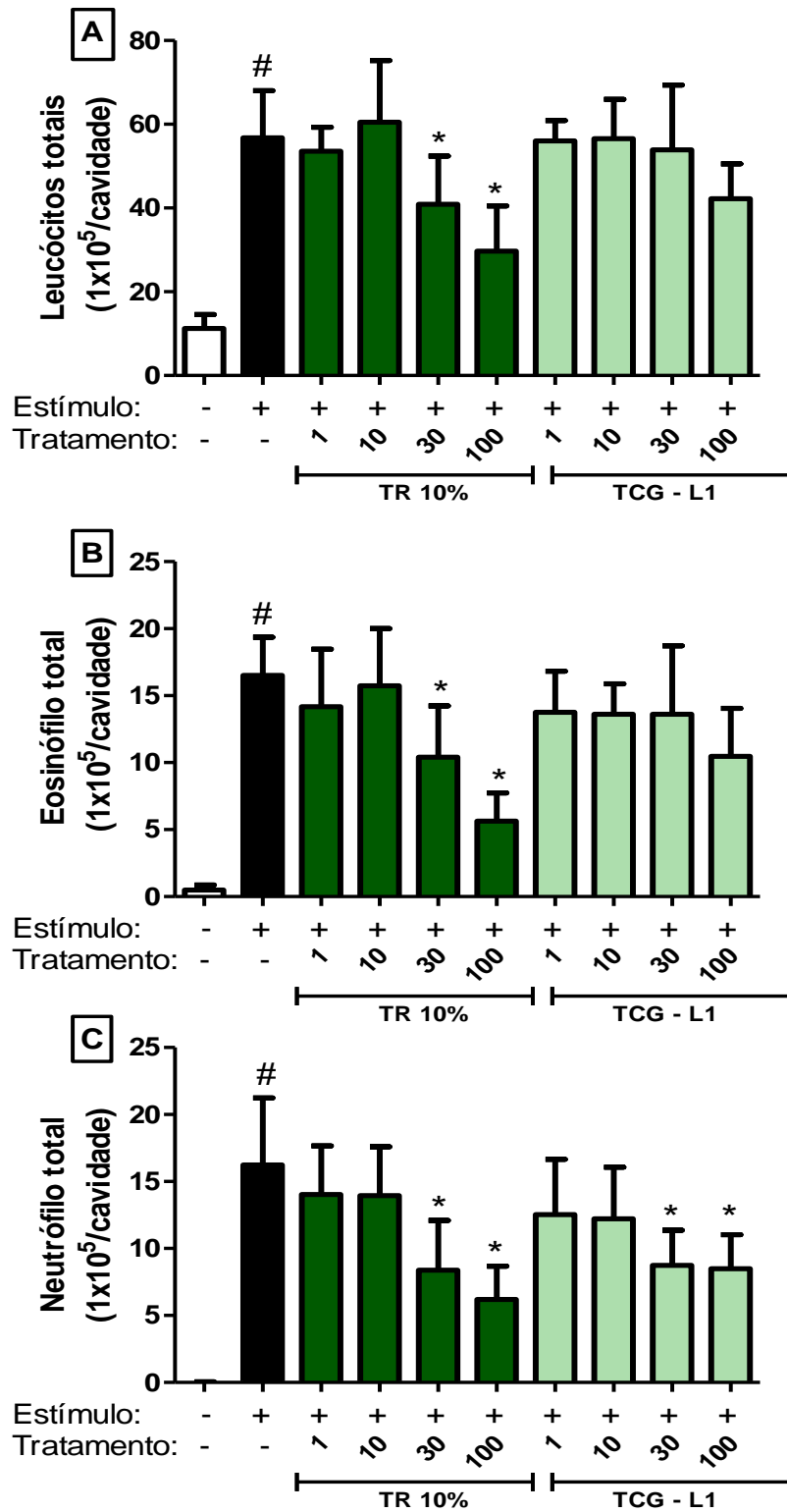


Legenda: Efeito *in vivo* da TR-L2 de *M. glomerata* (1, 10, 30 e 100 mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais (A) e populações de eosinófilos (B) e neutrófilos (C) na cavidade pleural de camundongos Balb/C (n=12) estimulados com OVA (50 µg/por animal). Camundongos foram tratados 1h antes do desafio. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente (p≤0.05) entre grupo estimulado (OVA) e não estimulado (Salina); * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado.

5.8 Efeito *in vivo* da tintura de Guaco comercial na pleurisia induzida por OVA

Após ter estabelecido a curva dose-resposta da TR, foi testada uma das amostras comerciais do L1, avaliando os mesmos parâmetros de celularidade na pleurisia alérgica. Como observado na figura 17A e B, apenas a TR-L1 foi capaz de reduzir significativamente o infiltrado leucocitário total e a migração de eosinófilos totais frente ao grupo estimulado com OVA nas maiores doses (30 e 100 mg/kg) . Quanto a população de neutrófilos presentes na cavidade pleural, ambas as tinturas nas doses de 30 e 100 mg/kg reduziram significativamente o quantitativo (Figura 17C).

Figura 17: Efeito *in vivo* das tinturas de Guaco referência (L1) e comercial (TCG-L1) na pleurisia alérgica.



Legenda: Efeito *in vivo* da TR-L1 e da TCG-L1 (1, 10, 30 e 100 mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais (A) e populações de eosinófilos (B) e neutrófilos (C) na cavidade pleural de camundongos Balb/C (n=6) estimulados com OVA (50 μ g/por animal). Camundongos foram tratados 1h antes do desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatística ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (OVA) e não estimulado (Salina); * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado.

5.9 Análise do efeito citotóxico das tinturas de Guaco referência e comerciais em linhagens J774A.1 e AMJ2-C11

A fim de descartar possíveis efeitos tóxicos das tinturas de Guaco nas linhagens celulares J774A.1 e AMJ2-C11, que viessem a inviabilizar as próximas etapas desse projeto, foi feita a análise da viabilidade celular através do ensaio de metabolização do MTT. A linhagem de macrófagos murinos (J774A.1) foi tratada com diferentes diluições (1/150, 1/250, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/5000 v/v) de TR, por 24 h, e a absorbância do produto gerado pela metabolização do MTT foi expressa em porcentagem na tabela 9. Como observado na Tabela 9, o solvente utilizado no preparo da TR (etanol 70%), assim como todas as diluições testadas, não apresentaram toxicidade para esta linhagem.

Já na linhagem de macrófagos pulmonares (AMJ2-C11) foram testadas a TR e as TCs em diferentes diluições (1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000 v/v), também por 24 h. Os valores em porcentagem da absorbância (Tabela 10) revelaram não haver toxicidade superior a 30%. Diante disso, todas as diluições foram utilizadas nos ensaios farmacológicos por apresentar viabilidade superior ao estipulado como a margem de segurança para este trabalho (70%).

Tabela 9: Efeito citotóxico da tintura de Guaco referência em linhagem de macrófagos murinos, J774A.1.

Amostra/ diluição	—	1/150	1/250	1/300	1/400	1/500	1/1000	1/2000	1/5000
Meio	100	—	—	—	—	—	—	—	—
Etanol 70%	—	100	—	—	—	—	—	—	—
TR	—	100	100	100	100	100	100	100	100

Legenda: Experimento realizado em quadruplicata (n=4). Dados da viabilidade celular expressos em porcentagem (%). TR – Tintura Referência.

Tabela 10: Efeito citotóxico das tinturas de Guaco referência e comerciais em linhagem de macrófagos pulmonares murinos, AMJ2-C11.

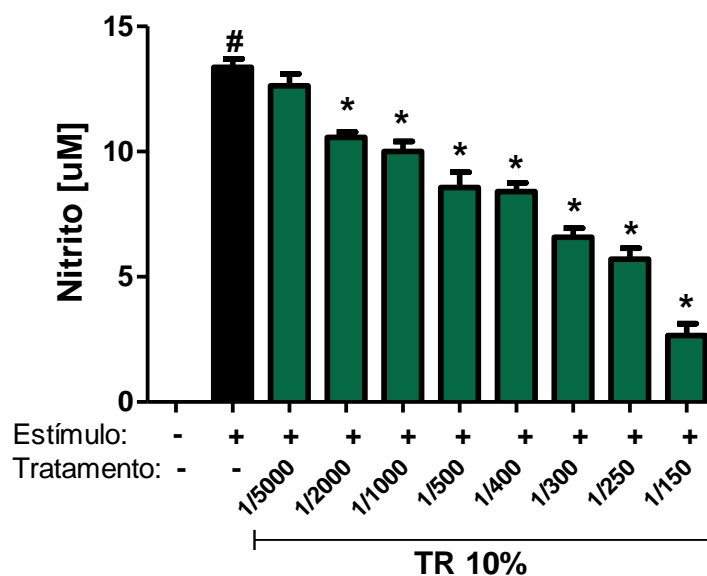
Amostra/diluição	—	1/100	1/200	1/300	1/400	1/500	1/1000
Meio	100	—	—	—	—	—	—
Etanol 70%	—	84	—	—	—	—	—
TR	—	71	85	83	85	85	88
TCT	—	90	85	82	78	77	88
TCB	—	97	80	94	84	82	84
TCF	—	100	95	98	90	100	93
TCI	—	91	96	93	100	94	93
TCG	—	100	100	97	100	100	90

Legenda: Experimento realizado em quadruplicata (n=4). Dados da viabilidade celular expressos em porcentagem (%). TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea

5.10 Avaliação da capacidade inibitória da tintura de Guaco referência na produção de óxido nítrico *in vitro* em linhagem J774A.1

Dando continuidade aos ensaios de atividade farmacológica, buscando a metodologia mais adequada para os ensaios comparativos entre tinturas, foi avaliado primeiramente a capacidade da TR em modular a inflamação através da quantificação de NO presente no sobrenadante de células J774A.1 estimuladas com LPS (1 µg/ml), e previamente tratadas com a TR diluída nas seguintes condições: 1/150, 1/250, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/5000 v/v. Após 24 h do estímulo com LPS, o NO foi quantificado e observou-se um aumento significativo desta produção no grupo estimulado e não tratado (LPS) quando comparado ao grupo não estimulado e não tratado (meio) (figura 18). Entre as diluições TR da mais concentrada (1/150) até a diluição de 1/2000, todas estas modularam a produção de nitrito, com exceção para a diluição de 1/5000. Dentre todas as diluições testadas a diluição de 1/150 foi a que apresentou a melhor resposta com um perfil de inibição de aproximadamente 77% (Figura 18), devendo-se levar em consideração que nesta faixa de concentração testada não há efeito citotóxico.

Figura 18: Produção de NO em células da linhagem J774A.1 estimuladas com LPS e tratadas com tintura de Guaco de referência.



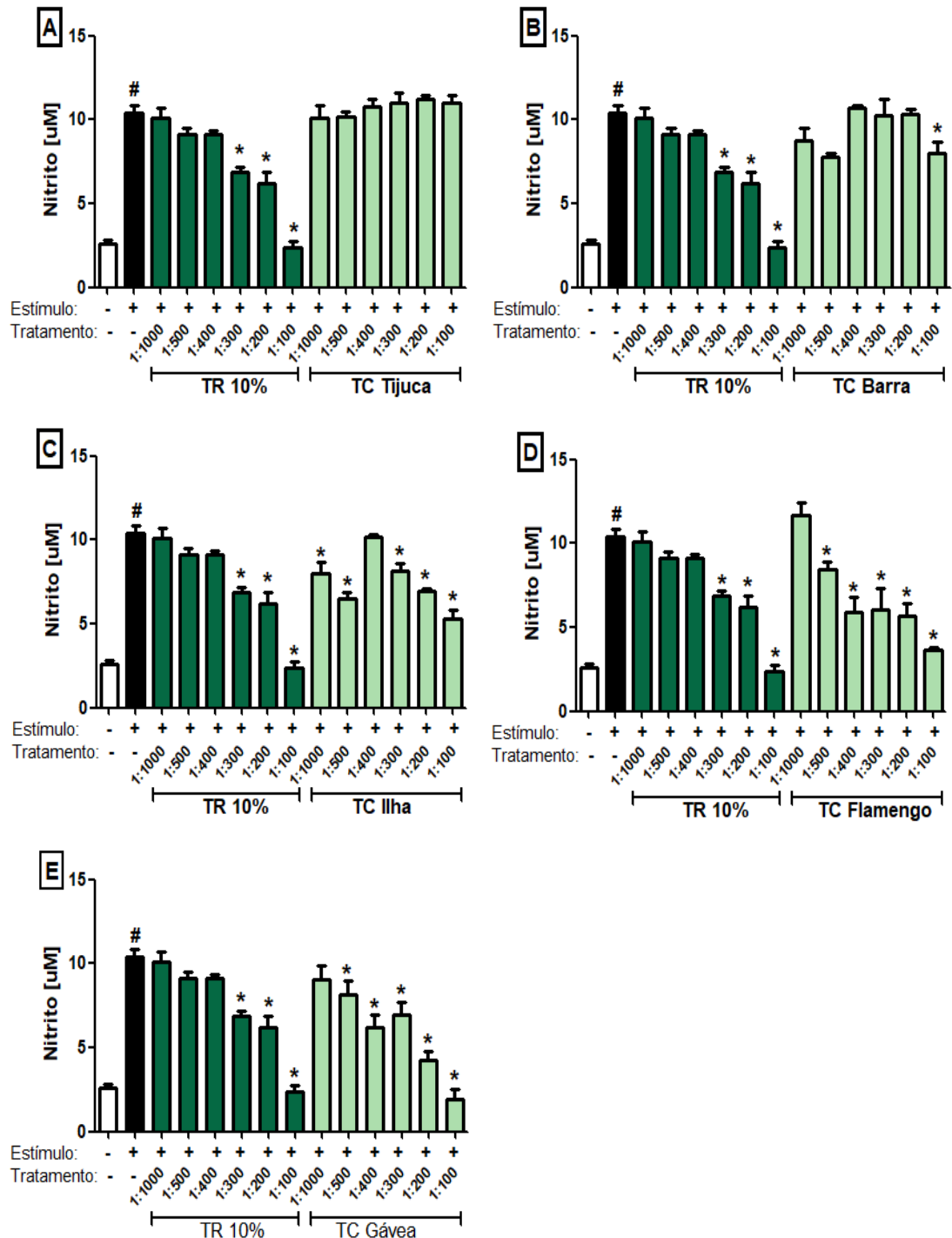
Legenda: A produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess através do sobrenadante recolhido 24h após a estimulação com LPS em células tratadas (3 ensaios individuais realizados em quadruplicata, total n=12) com a TR em diferentes diluições. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre grupo estimulado (LPS) e não estimulado (Meio); * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre grupo tratado e não tratado estimulado (LPS).

5.11 Avaliação da capacidade inibitória das tinturas de Guaco referência e comerciais na produção de óxido nítrico *in vitro* em linhagem AMJ2-C11

Com o intuito de verificar se as TCs possuem perfil farmacológico semelhante ao da TR sobre o NO produzido por células de macrófagos pulmonares (AMJ2-C11), foi feita a quantificação de NO em células tratadas por 24 h com a TR-L1 e as TCsL1 em diluições variadas (1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000 v/v) e estimuladas com LPS (1 µg/ml). Pode ser observado na figura 19, que o grupo estimulado e não tratado (LPS) apresentou resultado significativo quando comparado ao grupo não tratado e não estimulado (meio). Como já anteriormente observado, a TR reduziu significativamente, de maneira dose dependente, a concentração de NO (Figura 19).

Analisando as tinturas comerciais, pode-se observar que na TC Tijuca nenhuma diluição foi capaz, de forma significativa, de reduzir a produção de NO (Figura 19A). Quanto a TCB, apenas a menor diluição (1/100) apresentou aproximadamente 31% de inibição na produção de NO (Figura 19B). Na figura 19C, observa-se que nas diluições da TCI, com exceção da diluição 1/400, as demais foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO quando comparado ao grupo estimulado e não tratado. O mesmo pode ser visto nas TCF (Figura 19D) e TCG (Figura 19E). Dentre as tinturas comerciais analisadas duas se mostraram ineficazes (TCT e TCB) e outras duas apresentaram efeito inibitório máximo semelhante a TR, TCF e TCG, nas diluições de 1/100 (Figura 19D-E).

Figura 19: Produção de NO em células da linhagem AMJ2-C11 estimuladas com LPS e tratadas com tinturas de Guaco de referência (L1) e comerciais (L1).



Legenda: A produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess através do sobrenadante recolhido 24h após a simulação com LPS em células tratadas (n=4) com a TR-L1 em diferentes diluições, e com o L1 das TCT (A), TCB (B), TCI (C), TCF (D) e TCG (E). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (LPS) e não estimulado (Meio); * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre grupo tratado e não tratado estimulado (LPS).

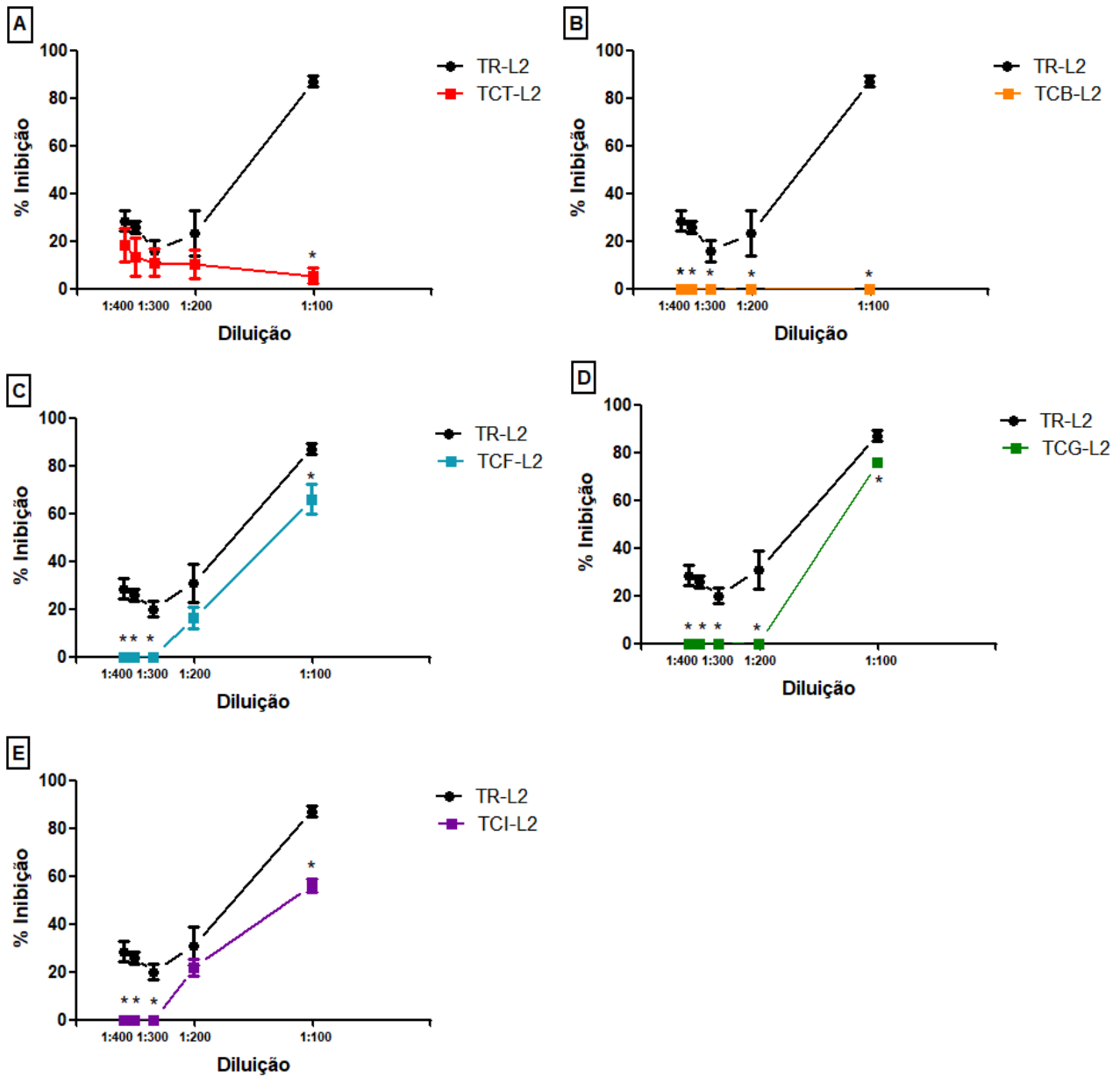
5.12 Avaliação da capacidade inibitória das tinturas de Guaco referência e comerciais na produção de óxido nítrico *in vitro* em cultura de macrófagos primários.

Seguindo com as análises comparativas do perfil farmacológico das tinturas na modulação de NO em cultura de macrófagos primários, foi feita a quantificação de NO em células tratadas por 24 h com a TR-L2 e as TCs-L2 e L3 em diluições variadas (1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 v/v) e estimuladas com LPS (1 µg/ml). Os resultados da atividade inibitória foram expressos em porcentagem de inibição nos gráficos das figuras 20 e 21.

A TR-L2 teve em sua maior concentração, um efeito inibitório de aproximadamente 87%, e na menor concentração um efeito de 28,5% de inibição (Figura 20). Um perfil similar foi visto na TCT-L2, onde as 4 primeiras concentrações apresentaram efeito similar ao da TR-L2, com exceção da maior concentração (7,1% de inibição – Figura 20A). Esse efeito não foi similar ao da TCT-L3, uma vez que esta não apresentou atividade inibitória em nenhuma concentração testada (Figura 21A). O mesmo foi encontrado na TCB-L2 (Figura 20B), mas já na TCB-L3 o efeito inibitório encontrado na concentração mais alta (19,1%) é estatisticamente diferente ao da TR-L2 (Figura 21B).

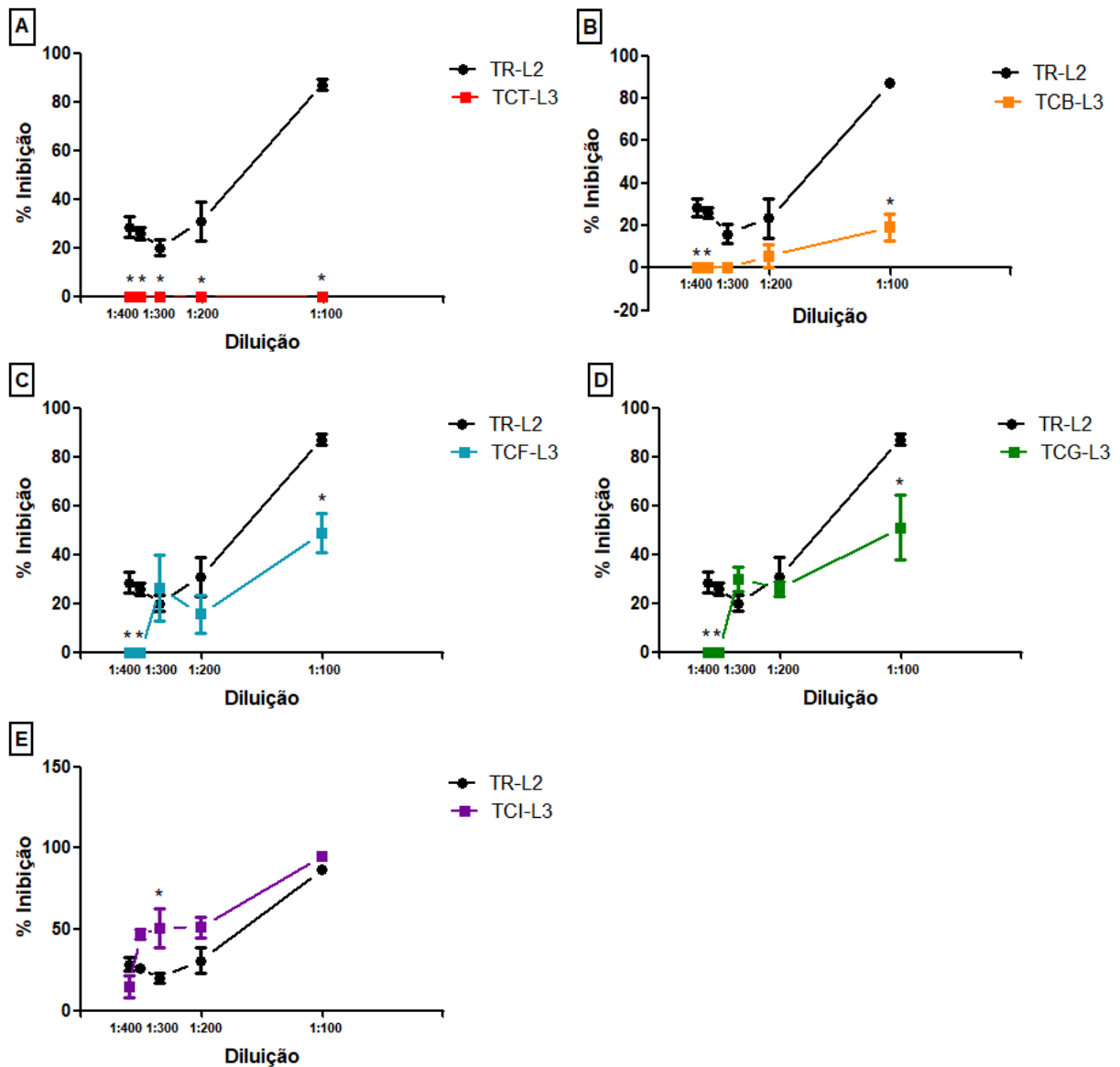
A TCF não apresentou efeito inibitório nas menores concentrações, e nas concentrações intermediárias o efeito foi similar ao da TR-L2, com exceção da maior concentração cujos valores tiveram uma diferença representada estatisticamente (TCF-L2 = 66% e TCF-L3 = 48,6% de inibição / Figura 20C e 21C). A TCG-L3 apresentou o mesmo perfil inibitório da TCF, onde as diluições intermediárias obtiveram atividade similar à da TR-L2, mas com divergência estatisticamente significativa na menor diluição (50,87% de inibição/ Figura 21D). Em relação ao L2 da TCG, apenas a menor diluição resultou um efeito inibitório de NO com 75,6% (Figura 20D). Por último, a TCI-L2 (Figura 20E) obteve resultado inibitório a partir da segunda maior concentração (21,7% e 56% de inibição), enquanto a TCI-L3 obteve atividade inibitória de NO em todas as doses, em perfil próximo ao TR-L2, com diferença estatisticamente significativa na diluição intermediária (Figura 21E).

Figura 20: Percentual de inibição da produção de NO em macrófagos tratados com a TR-L2 e TCs-L2.



Legenda: A produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess através do sobrenadante recolhido 24h após a simulação com LPS em células tratadas (n=4) com a TR-L2 em diferentes diluições, e com o L2 das TCT (A), TCB (B), TCF (C), TCG (D) e TCI (E). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre as tinturas.

Figura 21: Percentual de inibição da produção de NO em macrófagos tratados com a TR-L2 e TCs-L3.



Legenda: A produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess através do sobrenadante recolhido 24h após a simulação com LPS em células tratadas (n=4) com a TR-L2 em diferentes diluições, e com o L3 das TCT (A), TCB (B), TCF (C), TCG (D) e TCI (E). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre as tinturas.

5.13 Validação de método analítico por CLUE-EM/EM para estudo de resíduo de agrotóxico em matriz tintura de *M. glomerata* 10%

5.13.1 – Seletividade

Ao realizar a análise da TR proveniente de um horto orgânico, não foi constatado resíduo de agrotóxico em sua composição, dentre os IAs avaliados. Diante disso, a TR foi utilizada como “matriz branca” para o processo da validação.

5.13.2 – Faixa de trabalho/linearidade

Apenas as substâncias Aldicarbe sulfóxido, Casugamicina, Flusulfamida e Tolclofós metílico não apresentaram homogeneidade da variância para a faixa de trabalho analisada (0,01 µg/mL a 0,05 µg/mL). E a maioria das substâncias apresentou regressão significativa, com exceção de: 2,6-Diclorobenzamida, Azociclotina, Bifentrina, Casugamicina, Ciflutrina, Cihexatina, Clorfenapir, Diafentiurom, Dinotefuram, Esfenvalerato, Fenvalerato, Flusulfamida, Ivermectina, Parationa etílica, Procimidona, Propacloro, Propanil, Vamidotiona sulfona. Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) e os de correlação (r) das substâncias validadas podem ser encontrados no APÊNDICE A.

5.13.3 – Precisão/ repetibilidade

A repetibilidade foi considerada insatisfatória para os IAs que apresentaram CV $\geq 20\%$ em pelo menos um dos dois níveis de fortificação. Foram eles: 2,6-iclorobenzamida, Abamectina, Acibenzolar-s-metílico, Aldicarbe sulfóxido, Azadiractina, Azociclotina, Bromofos etílico, Bromofós metílico, Cartape, Casugamicina, Cianazina, Ciflutrina, Cihexatina, Cipermetrina, Cletodim, Clofentezina, Clorfenapir, Clorpirifós metílico, Diafentiurom, Dinotefuram, Doramectina, Esfenvalerato, Fenitrotiona, Fentiona, Fenvalerato, Flubendiamida, Flusulfamida, Ioxinil, Isocarbofós, Lambda-cialotrina, Lufeniurom, Metfuroxam, Metomil, Metribuzim, Novalurom, Parationa etílica, Procimidona, Profam, Propacloro, Propanil, Tolclofós metílico, Triforina e Vamidotiona sulfona. Os valores de precisão dos demais IAs validados se encontram no APÊNDICE B.

5.13.4 – Exatidão/taxa de recuperação

No APÊNDICE C, encontram-se os IAs que apresentaram a taxa de recuperação satisfatória dentro da faixa de 70% a 120%, em ambos os níveis de fortificação. As substâncias a seguir não atenderam a esse critério: 2,6-Diclorobenzamida, Abamectina, Acibenzolar-s-metílico, Alacloro 2, Azociclotina, Bifenazate, Bifentrina, Bromofos etílico, Carbosulfano, Cartape, Casugamicina, Cianazina, Ciflutrina, Cihexatina, Cletodim, Clorfenapir, Dazomete, Diafentiurum, Dinotefuram, Eprinomectina, Esfenvalerato, Fenvalerato, Flubendiamida, Flusulfamida, Ioxinil, Ivermectina, Lufenurum, Metfuroxam, Metoprene, Metribuzim, Parationa etílica, Procimidona, Profam, Propacloro, Proquinazide.

5.13.5 – Ingredientes ativos validados

Dos 330 IAs avaliados nesse presente estudo, 268 foram validados para a matriz tintura de *M. glomerata* 10%. A lista com essas substâncias validadas pode ser vista no APÊNDICE D. As substâncias presentes no anexo V da RDC 105/2016, que foram analisadas nas amostras comerciais, também estão presentes no APÊNDICE D.

5.14 Análise de resíduos de agrotóxicos em tinturas comerciais de Guaco.

As amostras comerciais foram submetidas à análise por CLUE-EM/EM utilizando a metodologia previamente validada. Na tabela 11 constam os resultados desta análise onde foram encontrados resíduos de carbendazim (CBZ) nas amostras TCF (L2 e L3) e TCI (L2 e L3), e resíduos de dimetomorfe (DMF) na TCI-L2. A tabela em questão informa os valores encontrados e seus respectivos limites de quantificação do método e se há limite máximo de resíduo permitido na 6^a ed. da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019d). Embora 3 destas amostras estejam abaixo do Limite de Quantificação do Método (LQM), e por isso não é possível quantificar com segurança os IAs em questão, uma vez que estes estão abaixo do menor valor estabelecido na curva analítica, os mesmos foram detectados e por isso sua presença é incontestável nestas amostras. A TCF-L3 apresentou valor de CBZ (0,0208 µg/mL) dentro da faixa de trabalho especificada no método (Tabela 11).

Tabela 11: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras comerciais de Guaco, por CLUE-EM/EM.

Amostra		IA	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	LQM ($\mu\text{g/mL}$)	LMR ($\mu\text{g/mL}$)
TCT	L1	ND	—	—	—
	L2	ND	—	—	—
	L3	ND	—	—	—
TCB	L1	ND	—	—	—
	L2	ND	—	—	—
	L3	ND	—	—	—
TCF	L1	ND	—	—	—
	L2	Carbendazim	< LQM	0,02	NA
	L3	Carbendazim	0,0208	0,02	NA
TCI	L1	ND	—	—	—
	L2	Carbendazim	< LQM	0,02	NA
		Dimetomorfe	< LQM	0,02	NA
	L3	Carbendazim	< LQM	0,02	NA
TCG	L1	ND	—	—	—
	L2	ND	—	—	—
	L3	ND	—	—	—

Legenda: Análise multiresíduos por CLUE-EM/EM dos três lotes de TCs. LQM – Limite de Quantificação do Método; LMR – Limite Máximo de Resíduo; ND – Não detectado, NA – Não autorizado. TR – Tintura Referência, TCT - Tintura Comercial Tijuca, TCB - Tintura Comercial Barra da Tijuca, TCF - Tintura Comercial Flamengo, TCI - Tintura Comercial Ilha do Governador, TCG - Tintura comercial Gávea, L1 - Lote 1, L2 - Lote 2, L3 - Lote 3

6. DISCUSSÃO

Há muito se utilizam diversas e variadas preparações a base de plantas como medidas curativas, paliativas e para tratamentos de inúmeras doenças na medicina tradicional popular (AGUIAR, 2014). A *M. glomerata* é uma espécie vegetal de interesse ao SUS e muito utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento, principalmente de afecções das vias respiratórias (CAMPOS, NASCIMENTO, SILVA, 2021). A fim de contribuir com os estudos relacionados à planta medicinal em questão e avaliar a qualidade das tinturas de guaco que tem sido ofertada no RJ, este trabalho avaliou parâmetros físico-químicos, microbiológicos, farmacológicos e realizou análise de resíduos em amostras comerciais.

As 15 amostras comerciais foram adquiridas em 5 farmácias de manipulação de redes e bairros diferentes da cidade do RJ, todas solicitadas como “tintura de guaco a 10%” sem a necessidade de uma prescrição médica. Diante disto, as amostras são caracterizadas como fórmula farmacêutica oficial e devem ser preparadas, obrigatoriamente, seguindo os requisitos farmacopeicos (BRASIL, 2007). O FFFB preconiza a preparação de tintura de *M. glomerata* com 10 g de folhas secas para cada 100 mL de álcool etílico 70%. (BRASIL, 2021a). E desta forma, a TR utilizada para as análises comparativas deste estudo foi realizada.

Previamente às análises de bancada, a primeira avaliação que foi realizada nas amostras comerciais foi a inspeção dos rótulos seguindo as orientações das legislações vigentes (BRASIL, 2007; BRASIL, 2009b, BRASIL, 2013). Todas as tinturas estavam indicadas como tintura de guaco, mas apenas a TCG indicou a espécie botânica utilizada, e ainda houve variação entre lotes (Tabela 4). A espécie *Guaiacum officinale* (TCG-L3) não pertence ao gênero nem a família da espécie *M. glomerata* (TCG-L2 e L3). Apenas a TCT informou a concentração da preparação (10%), mas no quesito “componentes da formulação”, a mesma descreve “água destilada q.s.p”, enquanto álcool 70% foi descrito na TCI e na TCG (L2 e L3). Novamente houve variações nos lotes da TCG (L3) onde uma delas apresenta a informação de álcool 65% como solvente. A TCI foi a única tintura que descreveu a posologia, mas com diferenças entre lotes e com a proposta sugerida pela farmacopeia (BRASIL, 2021a). Do ponto de vista legislativo, os rótulos não cumpriram o exigido, logo todas as amostras estão não conformes (BRASIL, 2007; BRASIL,

2009b, BRASIL, 2013). Aparentemente, os produtos industrializados a base de *M. glomerata*, tendem a cumprir os requisitos legislativos para rótulos (CARNEIRO, 2017), porém em amostras magistrais há certa carência de estudos nacionais.

Embora a edição mais atual da farmacopeia nacional e a monografia específica da espécie não exijam a realização de ensaios organolépticos para a tintura de Guaco, este é considerado a primeira etapa do controle de qualidade de um derivado vegetal (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2019a). Na literatura, existem dados da avaliação sensorial de tinturas de *M. glomerata* apenas de quando a mesma ainda era preconizada com a concentração de 20% p/v, e talvez este seja o principal motivo pelas divergências entre as TRs (OSORIO, 2002; ALVARENGA et al 2009). Osorio (2002) encontrou em sua tintura padrão uma coloração marrom-esverdeada e de aspecto límpido, dados também obtidos por Alvarenga e colaboradores (2009). Ambos os autores utilizaram preparações a 20% p/v, enquanto a TR do presente estudo foi preparada a 10% p/v e apresentou cor verde escura com aspecto translúcido no L1 e opaco no L2 (Tabela 5, Figura 6).

As análises comparativas com as TCs evidenciaram um desvio de qualidade bem acentuado em algumas amostras. As TCF, TCI e TCG apresentaram as características organolépticas mais próximas das TRs com a cor predominante sendo a verde com alguns tons diferentes e translúcidas, odor forte e característico da espécie, e sabor amargo e ardente. A TCB apresentou uma cor marrom avermelhada translúcida, odor suave e sabor adocicado, enquanto a TCT possuía cor laranja e odor e sabor bastante suave, quase imperceptível (Tabela 5, Figura 6). As informações fornecidas no rótulo da TCT indicam que talvez a amostra tenha sido diluída em água destilada, e por tal motivo aparenta ter uma cor tão destoante da TR (Tabela 4). Estas amostras evidenciam com clareza a diferença dos processos extrativos, e corroboram dados de desvio de qualidade que já vem sendo descritos em outros estados brasileiros há décadas (OSORIO, 2002; ALVARENGA et al 2009).

A análise do resíduo seco torna possível visualizar o potencial de extração do solvente e determinar o montante de substâncias solúveis no mesmo, no caso da tintura, o etanol. As TRs deste trabalho apresentaram 1,53% e 1,79% de resíduo seco no L1 e L2, respectivamente (Tabela 6). Embora ambas as tinturas tenham sido preparadas igualmente, seguindo os compêndios nacionais, o material botânico foi

coletado em épocas diferentes. Enquanto as folhas de *M. glomerata* utilizadas no preparo da TR-L1 foram coletadas no primeiro semestre do ano (2020), as utilizadas na TR-L2 foram coletadas durante a época de floração, na primavera do ano seguinte (2021).

Os metabólitos secundários são as substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas das plantas, e embora a literatura informe que a maior produção dos principais metabólitos da *M. glomerata* ocorra nos meses de janeiro a fevereiro e julho, e por tal motivo a colheita das folhas com propósitos medicinais devam ser feitos nesta época, estudos mais recentes tem gerado divergências (PEREIRA et al, 2000). Almeida (2019) encontrou valores de cumarina, metabólito secundário descrito como marcador químico da espécie *M. glomerata*, maiores durante a primavera por dois anos seguidos, e em localidades diferentes, enquanto realizava um estudo de sazonalidade em Santa Catarina (CZLUSNIAK, 2012; ALMEIDA, 2019). Em outro estudo de sazonalidade realizado em São Paulo, outros metabólitos secundários da espécie apresentaram altos valores na maior parte do ano, reduzindo apenas nos meses mais frios próximos a julho (ALMEIDA et al, 2017). Essas divergências caracterizadas por influências sazonais podem justificar as diferenças nos valores de resíduo seco e nos aspectos encontrados nos lotes da TR (Tabela 6, Figura 6).

Osório (2008) encontrou em sua tintura padrão de *M. glomerata* 20% um resíduo seco de 3,95%. Esses valores se assemelham com a TR deste estudo pelo fato de que a sua tintura com o dobro da concentração, apresentou praticamente o dobro de resíduo seco. Em trabalho de Souza e colaboradores (2020), ao analisar 5 tinturas de *M. glomerata* 10% (extraídas com etanol 96%), foi encontrado uma variação de 0,4 a 0,71% de resíduo seco. Esses dados corroboram os baixos valores encontrados na TCT (0,14, 0,11 e 0,20%) e na TCB (0,9, 0,89 e 0,98%), uma vez que tinturas preparadas com alcoolatura tanto abaixo quanto acima de 70% podem extrair menos metabólitos, como no caso da cumarina, evidenciado em trabalho realizado por Rocha e colaboradores (2008). As outras 9 amostras variaram de 1,14 a 1,65% entre os valores de resíduo seco, sendo a TCG-L3 (1,53%) e a TCI-L1 (1,65%) as que apresentaram valores mais próximos a faixa da TR (1,53 a 1,79%) (Tabela 6).

A presença de contaminantes microbianos pode ser resultado do não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação ou do gerenciamento inadequado da

matéria-prima vegetal. E estes contaminantes, além de ter a capacidade de gerar um quadro infeccioso no paciente, podem gerar alterações físico-químicas que venham a comprometer a estabilidade e conseqüentemente a qualidade do produto final (OLIVEIRA, 2017). A Farmacopeia brasileira preconiza que os limites microbianos (seção 5.5.3.1.5) para insumos farmacêuticos vegetais na forma farmacêutica de tintura não ultrapassem 10^4 UFC para bactérias aeróbicas e 10^2 UFC para fungos totais. Além destes parâmetros as tinturas devem ter ausência dos patógenos específicos *E. coli* e *Salmonella sp* (BRASIL, 2019d).

A literatura já descreveu a contaminação microbiana por *E. coli* em amostra de comprimido de *Mikania sp.* (FARIA et al, 2012). Também já foi visto a contaminação em folhas e xaropes caseiros de *M. glomerata*, com valores excedentes de fungo (CARMO, NOGUEIRA, SILVA, 2022). Já os fitoterápicos industrializados a base de *M. glomerata*, até o momento, não apresentaram contaminações acima do permitido para a legislação (SILVA et al, 2019; CARMO, NOGUEIRA, SILVA, 2022). E por hora, não há relatos de contaminação microbiológica em tinturas de Guaco.

O álcool 70% é descrito como a melhor concentração para se obter o melhor efeito bactericida, uma vez que na presença de água, o etanol permeia mais facilmente para dentro das bactérias podendo assim desnaturar proteínas desse microrganismo. Além disso, uma maior porcentagem de água permite um tempo maior de exposição do microrganismo ao etanol por retardar a volatilização do mesmo (ANDRADE et al, 2007). Diante disso, para descartar resultados do tipo falso negativo, uma vez que as tinturas são preparações extraídas com álcool 70%, ao iniciar as análises microbiológicas, as amostras foram submetidas ao teste de pesquisa de inibidor microbiano (Figura 7). Todas as amostras comerciais e as TRs apresentaram crescimento bacteriano positivo após 24 h de inoculação com *E. coli* e *Salmonella sp.* E por tal motivo foram consideradas com ausência de inibidor e seguiram para os demais testes microbiológicos. As TCs analisadas neste estudo cumpriram os requisitos legislativos, e por tanto estão aprovadas (Tabela 7). Os resultados indicam que, não só os estabelecimentos comerciais, mas também os fornecedores da matéria-prima cumpriram com as Boas Práticas (CFF, 2017).

A CMR é descrita na monografia específica da *M. glomerata* como o metabólito secundário majoritário. E por tal motivo ele é considerado o marcador

químico da espécie e o metabólito responsável parcialmente por suas principais atividades farmacológicas. Diante disso, a CMR presente nas tinturas foi analisada por CLAE-UV/DAD, utilizando uma metodologia previamente validada no INCQS (AGUIAR, 2014). Além do pico de CMR analisado no Tr 22,3 min, foram encontrados outros dois picos de alta intensidade em praticamente todas as amostras, e mais um 3º, bem próximo ao Tr da CMR no cromatograma da TR (Figura 9). Tais moléculas são desconhecidas no presente trabalho, assim como sua influência nas propriedades farmacológicas. As análises foram voltadas para a CMR por ser o marcador químico oficial descrito nos compêndios atuais.

A TR-L2 desse estudo apresentou 0,36 mg/mL de CMR em sua composição (Tabela 8). Assim como Rocha e colaboradores (2008), a tintura de *M. glomerata* 10% p/v extraída com etanol 70%, foi preparada após estabilização do material vegetal por secagem em estufa com circulação de ar por 48 h a 50° C. Esse trabalho foi citado na monografia específica da *M. glomerata* (2018) como base para demonstrar a forma de preparo que garante o melhor teor de CMR em tinturas dessa espécie. O teor de CMR encontrado pelos autores foi de 0,47 mg/mL. Esse valor está em consonância com a TR do presente estudo, evidenciando que o processo extrativo ocorreu como o esperado (ROCHA et al, 2008, BRASIL, 2018a).

Muitos trabalhos foram publicados nos últimos anos dosando metabólitos secundários nas folhas e derivados de *M. glomerata*. É um tanto quanto desafiador confrontar os dados presentes com os da literatura, uma vez que os estudos mais recentes encontram valores bem diferentes de CMR, porém em circunstâncias também diferentes. Dos trabalhos elencados na tabela 12, o E e o I foram os únicos que realizaram processos extrativos na mesma proporção (10% p/v com etanol 70%) que a TR. Apenas um apresentou o valor de CMR (4,28 mg/g) similar ao da TR-L2 (3,69 mg/g), enquanto no outro houve uma variação de 0,049 a 0,121 mg/g. Vale ressaltar que não há muitas informações sobre a origem do material botânico do estudo E, enquanto ao I, as folhas foram coletadas nos meses de julho a agosto.

Tabela 12: Publicações nacionais recentes sobre o doseamento de CMR em *M. glomerata*.

Referência	Coleta das folhas	Estabilização	Extração	Alcoolatura	Metabólitos
[A] Rocha et al, 2008	RJ	Secagem em estufa a 40° C por 48h	Tintura 10% p/v	70%	CMR – 0,47 mg/ml
[B] Costa et al, 2018	Junho 2015 - SP	Congelamento em nitrogênio líquido	Extrato hidroalcoólico 200mg/3mL	70%	CMR - 0,3 mg/g ACL - 30.4 mg/g ACU - 33.3 mg/g ADC - 174.6 mg/g
[C] Almeida et al, 2017	Dezembro 2012 a novembro de 2013 - SP	Liofilizadas por 50h	Extrato hidroalcoólico 200mg/3mL	70%	CMR - 0,7 mg/g (sem variação anual) ACL - 2,3 mg/g ADC - 14,63 mg/g (Reduzindo em abril e julho)
[D] Della Pasqua et al, 2019	SP	Congelamento em nitrogênio líquido	Extrato aquoso	–	CMR - 0,023 mg/g ACU - 0,121 mg/g
[E] Santos, 2018	Primavera/verão 2014 a 2015 - SC	Secagem em estufa a 42° C	Extrato aquoso	–	CMR 0,143 a 1,05 mg/kg
[F] Gouvêa et al, 2018	–	–	Extrato etanólico 10%	70%	CMR - 4,28 µg/ mg
[G] Almeida, 2019	Verão 2012 a Primavera 2014 – SC	Secagem a sombra por 96h	Extrato hidroalcoólico	50%	CMR em maior valor na primavera dos 2 primeiros anos (0,19 e 1,98 mg/g) e no verão do terceiro (1,3 mg/g)
[H] Borgh, Almeida, Sawaya, 2019	SP	Secagem em estufa a 40° C por 48h	66,6mg em 1mL etanol	70%	CMR - 7,2 µg/ mL ÁCL ± 50 µg/ mL ADC ± 560 µg/ mL ACU ± 60 µg/ mL
[I] Vieira et al, 2020	Julho a Agosto 2015	Secagem em estufa a 55° C por 72h	Extrato etanólico 10%	70%	CMR – 4,9 a 12,1 ÁCU – 177,7 a 543,8 mg/ 100g
[J] Melo, Sawaya, 2020	SP	Secagem em estufa a 40° C por 50h	Extrato hidroalcoólico 20%	67%	ACL ± 450 µg/mL
[K] Moreira et al, 2020	Abril 2017 - MG	Secagem em estufa a 40° C por 48h	Tintura 20%	70%	ACU - 0,93 mg/mL
[L] Bertol, 2021	SP	Secagem a 45° C	Extração etanólica 1%	70%	CMR <0,25% ADC – 3% ACU - 0,3%

Legenda: CMR – Cumarina, ACL – Ácido clorogênico, ACU – Ácido Caurenóico, ADC – Ácido Dicafeoilquinico, ± representa um valor aproximado. Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Apesar dos processos extrativos similares, a divergência do valor de CMR da TR-L2 e do estudo I estão de acordo com estudo de sazonalidade de Almeida (2019), onde foram encontrados valores mais altos de CMR na primavera por dois anos seguidos, assim como na TL-R2 que foi coletada no mês de outubro.

Muitos outros trabalhos apresentaram valores de CMR abaixo da TR (B = 0,3 mg/g; C = 0,7; mg/g; H = 7,2 µg/mL), e embora todos sejam extratos hidroalcoólicos de proporção p/v igual, o material vegetal foi coletado em épocas diferentes e com processos de estabilização também diferentes. O etanol tem um papel fundamental na extração da CMR, como anteriormente mencionado, e fica evidente sua importância nos trabalhos que dosaram CMR em extratos aquosos e que encontraram valores irrisórios do metabólito (D = 0,0023 mg/g e E = 0,0001 mg/g) (Tabela 12).

Algumas das TCs também apresentaram grandes variações de CMR na sua composição (Tabela 8). Em 6 amostras, pode-se observar a faixa de variação de 2,23 a 5,07 mg/g de CMR. Valores que variaram aproximadamente 1,4 mg/g da TR-L2 (3,69 mg/g). Mas em 3 dessas amostras a variação foi maior, com expressivos 3,3 mg/g (TCB) e 3,6 mg/g (TCT-L1 e L2). Nas TCB e TCT os espectros de absorção molecular apresentaram pouca similaridade ao da CMR padrão, provavelmente devido à baixa intensidade do sinal (Figura 13 e 14). Os resultados das TCs apresentaram valores bem similares de CMR entre lotes, com exceção da TCF, que foi encontrado 2,84 mg/g de variação (Tabela 8). Esses achados parecem estar em consonância com os valores observados na análise de resíduo seco (Tabela 6).

Como a literatura nos últimos anos tem apontado baixos valores de CMR, até mesmo em estudos de sazonalidade da *M. glomerata*, os autores têm apostado em outros metabólitos secundários que poderiam contribuir com a identificação química da espécie. E sugerem ainda, que pelo fato da CMR não parecer ser o metabólito majoritário (Tabela 12), essas outras moléculas poderiam ser as principais responsáveis por suas atividades farmacológicas, uma vez que a literatura já evidenciou tais atividades (VIEIRA et al, 2020; BERTOL, COBRE, PONTAROLO, 2021), mas isso ainda demanda mais estudos. Os compêndios oficiais atribuem à CMR o título de marcador químico, e por essa razão o doseamento dela é utilizado como o controle de qualidade da espécie vegetal em questão. Por esse motivo, determinar o valor de CMR presente num fitoterápico de *M. glomerata* que é suficiente

para de fato exercer suas principais atividades farmacológicas foi uma das lacunas científicas que esse trabalho se propôs a preencher.

A *M. glomerata* é muito utilizada na medicina tradicional para tratar principalmente as doenças respiratórias, e por tal motivo foi utilizado modelos *in vivo* de alergia e *in vitro* de inflamação para analisar sua eficácia terapêutica e correlacionar com os achados na dosagem da CMR. Utilizando a metodologia de pleurisia alérgica induzida por OVA, foi investigada a capacidade da TR interferir em parâmetros de celularidade alterados pelo alérgeno em questão.

A TR-L1 foi utilizada para tratar camundongos Balb/C sensibilizados com OVA. A curva de 5 doses foi calculada a partir do valor do resíduo seco (TR-L1 = 0,1, 1, 10, 30 e 100 mg/kg). Após a coleta do lavado pleural, foi feita a contagem de leucócitos totais e diferenciais (Figura 15). Onde foi encontrado uma redução do número de dos leucócitos a partir da dose 10 mg/kg. Esse efeito foi mais proeminente na população de eosinófilos (a partir de 1 mg/kg) e menor na de neutrófilos (reduziu em 30 e 100 mg/kg). O efeito da TR-L2 se comportou de forma semelhante (Figura 16), com a diferença de que doses menores obtiveram resultado estatístico significativo em diminuir o infiltrado de leucócitos totais em 10 mg/kg e de neutrófilos em 10 mg/kg. Esses dados parecem estar de acordo com os achados do resíduo seco, uma vez que a TR-L2 apresentou 2,65 mg/mL de resíduo a mais que a TR-L1 (Tabela 6).

Em processos alérgicos que requerem a sensibilização específica do alérgeno, quando o organismo é exposto novamente ao antígeno, ocorre a ativação e secreção de um amplo espectro de mediadores cujo alvo são células que irão causar dano nos tecidos locais através da infiltração leucocitária e exacerbação das respostas inflamatórias (FIERRO et al, 1999). A pleurisia alérgica em roedores é caracterizada por uma exsudação acentuada seguida pelo influxo de granulócitos, num primeiro momento por neutrófilos e em seguida por eosinófilos (AGRA et al, 2016). E por tal motivo o influxo de leucócitos totais, neutrófilos e eosinófilos são contabilizados nesse modelo experimental.

A literatura já havia evidenciado a atividade antialérgica do extrato etanólico de *M. glomerata* 10%, onde ratos Wistar sensibilizados com OVA foram capazes de

reduzir o infiltrado de eosinófilos e neutrófilos na pleura de animais tratados com 10 mg/kg de extrato v.o. A dose de 100 mg/kg ainda foi capaz de reduzir a degranulação de mastócitos estimulados com carragenina. Como o extrato não reduziu o volume do exsudato ou o número de leucócitos totais, mas sim a degranulação de mastócitos, e o infiltrado de leucócitos específicos, o autor sugere uma atividade antialérgica pertinentes à ação sobre os mastócitos e à migração de granulócitos (FIERRO et al, 1999). Esses dados parecem divergir parcialmente dos encontrados na TR desse estudo, uma vez que a TR-L1 (10 mg/kg) e a TR-L2 (1 mg/kg) apresentaram efeito inibitório sobre os leucócitos totais no lavado pleural (Figura 15 e 16). O autor também administrou a CMR (10 mg/kg) isolada nos animais analisando unicamente o efeito no número de leucócitos recrutados (FIERRO et al, 1999). E como não houve redução, esse dado pode indicar que os efeitos vistos na TR não são exclusivos da CMR, uma vez que ocorreu atividade anti-inflamatória a partir da dose 1 mg/kg, contendo uma quantidade de CMR (0,02 mg/kg) bem abaixo da testada por Fierro e colaboradores (Quadro 4).

Quadro 4: Relação de CMR presente nas doses de TR-L2 utilizadas *in vivo*.

	Dose (mg/kg)	CMR (mg)	CMR (mg/kg)
TR-L2	1	0,00069	0,02
	10	0,0069	0,27
	30	0,019	0,82
	100	0,063	2,74

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Em trabalho mais recente, foi visto a ausência de efeito farmacológico do extrato aquoso de *M. glomerata* em ratos Wistar induzidos à pleurisia com carragenina, mesmo na dose mais alta de 400 mg/kg. Os autores ainda, realizaram o ensaio de degranulação de mastócito observando que não houve efeito na redução da liberação de histamina em células tratadas com o extrato ou com a CMR isolada. (DELLA PASQUA et al, 2019). Essa ausência de atividade pode ser explicada pelo baixo teor de CMR no extrato (0,023 mg/kg), uma vez que essa molécula não possui

boa solubilidade em meio aquoso (SILVA et al, 2016). E por tal motivo, os dados divergem das atividades farmacológicas encontradas na TR-L2 que apresentou 2,74 mg/kg de CMR na dose de 100 mg/kg (Quadro 4). Em todo caso, como mesmo em doses menores da TR-L2, e conseqüentemente menores quantidades de CMR, houve atividade anti-inflamatória, acaba sendo mais um indicativo de que outros metabólitos secundários possam estar envolvidos.

O presente estudo demonstrou que a tintura de *M. glomerata* a 10%, quando preparada de acordo com 2ª edição da FFFB, utilizando folhas coletadas na época da floração (primavera/outubro), apresentam efeito farmacológico *in vivo* com 0,27 mg/kg de CMR. Esse valor de CMR poderá ser associado com os métodos de controle de qualidade de doseamento químico da espécie. Uma vez que pela posologia indicada no FFFB, 1 mL de tintura deve ser diluído em 50 mL de água para ser consumido ao dia (BRASIL, 2021a). Logo, se a tintura com 0,369 mg/ mL de CMR for diluída em 50 mL de água, a quantidade de CMR diluída (aproximadamente 0,007 mg) será equivalente a encontrada na menor dose (10 mg/kg) que teve efeito nos 3 parâmetros analisados *in vivo* (Quadro 4).

Ao testar uma das amostras de TCs de Guaco (Figura 17), foi visto de forma clara a diferença no recrutamento celular durante a pleurisia alérgica com OVA. Enquanto a TR conseguiu reduzir tanto o infiltrado leucocitário total, como as populações específicas de granulócitos nas 2 maiores doses, a TCG teve efeito apenas sobre a migração de neutrófilos, sugestionando que sua ação seja específica para essa população, não tendo efeito significativo sobre os demais parâmetros.

Embora tenha sido evidenciada a capacidade da TR em reduzir o recrutamento leucocitário em modelo *in vivo* de pleurisia alérgica, e ter sido demonstrado o potencial desse modelo para realizar os ensaios comparativos entre tinturas, este protocolo é pouco prático para ser utilizado como um método de controle de qualidade farmacológico, uma vez que do início da sensibilização dos animais à OVA até o dia da coleta do lavado pleural, totaliza 15 dias de ensaio. Levando esse fato em consideração conjuntamente com os preceitos dos 3 Rs estabelecidos pela CEUA, principalmente ao que diz respeito a *Replacement* (substituição), optou-se por não prosseguir as análises com as demais TCs, dando início então as pesquisas *in vitro* (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004; CEUA, 2015).

O próximo ensaio realizado foi a avaliação do efeito citotóxico frente às linhagens de macrófagos, com o objetivo de descartar resultados do tipo falso negativo. Caso a viabilidade celular fosse comprometida por uma toxicidade causada pelas tinturas, isso levaria a uma baixa produção de mediadores inflamatórios e conseqüentemente a uma interpretação errônea dos resultados.

O ensaio de MTT se tornou o padrão ouro para determinar a viabilidade e proliferação celular desde a década de 80. Nesse ensaio as células ativas metabolicamente são capazes de reduzir o sal de tetrazólio (amarelo) em cristal de formazam (roxo). A quantificação por espectrofotometria, dos cristais dissolvidos, é uma correlação direta com a quantidade de células viáveis (TONDER, JOUBERT, CROMARTY, 2015). As linhagens de macrófagos após 20 h de exposição com as diferentes diluições das tinturas, e mais 4 h para a metabolização do sal de tetrazólio, tiveram o MTT quantificado em seu sobrenadante. Como demonstrado na tabela 9 e 10, tanto a TR quanto as TCs não apresentaram efeito citotóxico acima de 30%, e, portanto, todas as diluições testadas foram aprovadas para os demais ensaios de atividade farmacológica.

O NO é uma importante molécula do sistema de defesa, podendo ser produzido por células do endotélio vascular, da musculatura lisa, fibroblastos, monócitos, mastócitos e macrófagos, quando estimuladas por citocinas ou produtos bacterianos (LPS). Essa molécula atua como vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular, aumenta a adesão vascular de leucócitos e é um agente citotóxico mediado por macrófagos em processos infecciosos (BRITO et al, 2021; LIY et al, 2021). Diante disso, o NO foi dosado no sobrenadante de linhagens de macrófagos utilizando o ensaio colorimétrico de Griess. No primeiro momento foi feita uma curva de concentração/efeito utilizando 8 diluições (1/150 a 1/5.000) da TR-L1 em linhagem J774.A1 (Figura 18). A maior diluição (1/5.000) foi a única que não obteve resultado estatístico significativo diferente ao grupo não tratado (LPS), e todas as demais foram capazes de reduzir a produção de NO.

Ajustando a faixa de trabalho das tinturas para 6 diluições (1/100 a 1/1.000), foi feito um novo ensaio com células da linhagem de macrófagos pulmonares AMJ2-C11 com o intuito de comparar o efeito da TR-L1 com as TCs-L1. No mês que todas as TCs-L1 foram adquiridas, a TR-L1 havia sido preparada há 6 meses, e diante disso,

pode-se observar uma redução da efetividade da TR sobre a redução do NO (Figura 19). A TCI-L1 apresentou capacidade inibitória em todas as diluições testadas, enquanto a TCF-L1 e TCG-L1 não apresentaram resultado estatisticamente significativo apenas na menor concentração (1/1.000). Essas 3 tinturas obtiveram uma atividade farmacológica mais acentuada que a TR-L1. A TCT-L1 foi incapaz de inibir a produção de NO em todas as diluições testadas, o mesmo pode ser visto na TCB com exceção da maior concentração (1/100). A ausência de atividade farmacológica dessas TCs parece estar de acordo com os baixos valores de resíduo seco encontrado para ambas (Tabela 6), uma vez que menores valores de resíduo representam uma menor extração de metabólitos secundários. Assim como já foi visto por Ferreira (2018) a relação diretamente proporcional da quantidade de polifenóis com o resíduo seco de tinturas de Mulungu (*Erythrina velutina*).

O ensaio de dosagem do NO se mostrou uma ferramenta interessante para comparar o perfil de atividade anti-inflamatória entre as tinturas de Guaco, e a partir disso foram feitos novos testes utilizando a TR-L2 e as TCs-L2 e L3. Enfrentando um viés ainda desconhecido, ambas as linhagens J774.A1 e AMJ2-C11, não mais estavam sendo ativadas pelo LPS. Por tal motivo foi utilizada a cultura de células primárias descrita no item 4.8.1. Então ao testar ambos os lotes, foi vista a ineficiente capacidade inibitória da TCT-L3 (Figura 21A) e da TCB-L2 e L3 em ambos os lotes (Figura 20B e 21B), quando comparada com a curva da TR-L2, corroboram os dados encontrados no L1 (Figura 19). Esses dados parecem estar de acordo com os baixos valores de CMR em sua composição (Tabela 8). Inesperadamente a TCT-L2 (CMR = 0,07 mg/g) apresentou um percentual de inibição próximo da TR-L2 nas maiores diluições (Figura 17A).

As demais TCs obtiveram um padrão de desempenho próximo ao da TR-L2 (Figura 20 e 21 – C, D, E), assim como na análise do L1 (Figura 19 C, D, E). Mas a TCI-L3 foi a que obteve uma curva de percentual de inibição mais próxima da TR-L2 (Figura 21E). Essa tintura possui 1,23 mg/g de CMR a mais que a TR-L2, e embora a TCI-L2 também tenha mais cumarina (1,15 mg/g), o efeito inibitório foi menos acentuado em relação a TR (Figura 20E). O fato da TCF-L2 e L3 ter uma similaridade no perfil inibitório de NO (Figura 20C e 21C) mesmo quando o valor de CMR de um lote é maior que o dobro do outro (Tabela 8), sugere que a atividade anti-inflamatória não seja exclusivamente desencadeada por esse metabólito. Curiosamente, ambos

os picos cromatográficos de alta intensidade, cujas moléculas por hora são desconhecidas e estavam presentes em todas as amostras (Figura 9 a 15), não parecem interferir nos resultados de atividade anti-inflamatória, uma vez que as tinturas que apresentaram baixo ou nenhum efeito anti-inflamatório (TCT e TCB) também possuíam tais picos (Figura 14 e 15).

Na literatura há bastante trabalhos que consolidam a utilização do método de dosagem do NO *in vitro* como forma de avaliar a atividade anti-inflamatória de produtos naturais. Trabalhos como o de Lau e colaboradores (2021), que avaliou entre os extratos de caules e folhas de *Apium graveolens* L., qual possui a melhor atividade anti-inflamatória na redução de NO produzido por células RAW 264.7 estimuladas com LPS. O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar os extratos metanólicos de folhas, raízes, casca e frutos da espécie vegetal *Sarcocephalus pobeguinii* (NJOYA et al, 2017). A linhagem J774 parece predominar nos estudo nacionais para esse tipo de análise. Justo e colaboradores (2015) utilizando a linhagem J774 e uma cultura primária de macrófagos murinos ativados com LPS, analisaram a capacidade das espécies *Zingiber officinale* Roscoe e *Rosmarinus officinalis* L., com diferentes sistemas de dispersão, em interferir na produção de NO. Outros trabalhos utilizando uma metodologia similar a anterior em macrófagos da linhagem J774.A1, mensurou a atividade inibitória de NO de frações com polaridades diferentes das espécies *Lychnophora passerina* e *Solidago chilensis* Meyen. (OLIVEIRA et al, 2011; BRITO et al, 2022).

A partir do mencionado no parágrafo anterior, somado com os resultados vistos no presente trabalho, pode-se inferir que o protocolo utilizando os ensaios comparativos *in vitro* poderia ser utilizado como um método de controle de qualidade de atividade farmacológica dos derivados da *M. glomerata*, uma vez que a execução dessa metodologia é relativamente simples e com a obtenção dos resultados em 24 h.

Com o aumento da demanda nacional por plantas medicinais e seus derivados, associado ao fato de que essas culturas possam estar contaminadas propositalmente ou indiretamente por resíduos de agrotóxico, a ANVISA, por meio da RDC 105/2016, estabeleceu uma lista com os resíduos de agrotóxicos que deveriam ser investigados em fitoterápicos previamente ao registro (BESIL et al, 2017). Como

ainda não há métodos oficiais para a determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais destinadas a produção de medicamentos fitoterápicos, esses devem ser validados. A ANVISA acatou as determinações da Norma SANTE, alternativamente à RDC 166 de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (SANTE, 2020; SILVA, SILVA, ROSSETO; 2022).

A fim de gerar dados de interesse ao setor público ou privado, foi validada neste trabalho, uma metodologia para analisar 268 resíduos de agrotóxicos na matriz tintura de *M. glomerata* 10% por CLUE-EM/EM. A validação do método foi realizada nessa matriz, e não nas folhas, pelo simples motivo de que o processo extrativo para o preparo da tintura (etanol 70%) pode carrear resíduos que não seriam encontrados em outros tipos de preparo do material vegetal. Além disso, a tintura é incorporada no preparo dos xaropes de Guaco, e ambas as formas farmacêuticas dessa espécie vegetal são muito comercializadas no Brasil (ROCHA 2008, SOUZA, PORFIRO, FILHO MENEZES, 2022).

A literatura já relatou a presença de agrotóxicos em amostras de *Mikania sp.* Rodrigues e colaboradores (2007) encontraram hexaclorobenzeno, dieldrin e 4,4'-DDE em amostras de *Mikania sp.*, adquiridas no mercado de Jundiaí (SP), através de CG-EM. Santos (2018) validou uma metodologia para analisar 48 resíduos de agrotóxico, por CG-EM/EM, na matriz de folhas de *M. glomerata*. Ao realizar a análise de 4 amostras comerciais, provenientes de Santa Maria (RS), uma delas apresentou o resíduo clorpirifós em sua composição (SANTOS, 2018).

No estudo aqui apresentado, após a validação do método analítico em CLUE-EM/EM, os 3 lotes de TCs foram processados, e foi encontrado a presença de CBZ em 4 amostras, sendo que uma dessas ainda possuía DMF em sua composição (Tabela 11). A legislação brasileira preconiza que só é permitido o uso de agrotóxicos em culturas de plantas medicinais quando estas também forem destinadas ao consumo alimentício humano, como o caso do alho e da hortelã, por exemplo. Por outro lado, é possível encontrar no volume 1 da 6ª ed. da Farmacopeia Brasileira, uma lista intitulada "Limite aceitável de resíduos de agrotóxicos em mg/kg da droga vegetal", onde ambos, CBZ e DMF, não estão presentes (BRASIL, 2019d). Diante disto e somado ao fato anteriormente mencionado, pode-se inferir que estas 4 amostras estão reprovadas pelo olhar legislativo.

O CBZ é um fungicida benzimidazol de amplo espectro muito utilizado na agricultura, e por apresentar uma degradação muito lenta, ele pode persistir no ambiente por longos períodos, deixando resíduos em alimentos, água e plantas medicinais (ZHANG et al, 2022). O IA já foi proibido em diversos países da Comunidade Européia. E no Canadá e nos Estados Unidos da América ele não é registrado para o uso em culturas alimentares por apresentar características carcinogênicas, mutagênicas e toxicológicas a nível reprodutivo (SILVA, BARROS, PAVÃO, 2014).

Um estudo avaliou a toxicidade do CBZ frente ao desenvolvimento de embriões de Zebrafish onde foi encontrado de forma dose-dependente o aumento da taxa de deformação em até 96 h pós-fecundação, com deformidades na cauda e edema no pericárdio sendo os parâmetros mais encontrados. Sendo que as concentrações mais altas testadas do CBZ (1,6 e 1,28 µg/mL) apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% da população exposta. O mesmo estudo demonstrou que a taxa de mortalidade desse IA aumentou, em concentrações mais baixas, quando os embriões foram expostos ao IA clorpirifós concomitantemente (FAN et al, 2021a). O CBZ, em ratos Wistar machos tratados oralmente (50 mg/ kg/ dia) por 20 dias, induziu a redução do peso relativo da próstata e o aumento dos valores de estradiol na corrente sanguínea quando comparado com o grupo não exposto. Além disso, o IA foi capaz de causar estresse oxidativo, o que pode impactar na espermatogênese e na saúde reprodutiva mesmo em indivíduos jovens (GARCIA et al, 2021).

Até 2019, o CBZ era um dos IAs mais comercializados no Brasil, ocupando a 16ª posição, com 74 produtos técnicos e formulados registrados. Com o surgimento de tantas novas evidências científicas acerca do grau toxicológico dessa substância, uma nova análise do seu registro se fez necessária. Após a reavaliação toxicológica do IA, que está enquadrado na categoria toxicológica 1B e que até o momento não foi possível estabelecer a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do ativo, a ANVISA aprovou a proposta da RDC 739 que proíbe a sua produção, importação, exportação, comercialização e uso no Brasil. Mas essa retirada será gradativa para que não ocorram grandes impactos econômicos, e com isso o IA ainda será utilizado em solo brasileiro pelos próximos anos (BRASIL, 2022c).

Já o DMF, fungicida morfolínico de amplo espectro, está registrado junto à ANVISA para a utilização em mais de 50 culturas. Em sua monografia consta a IDA de 0,2 mg/kg p.c. e possui classificação toxicológica grau 4, sendo um produto pouco tóxico (BASF, 2020). Existem poucos estudos sobre a toxicidade do DMF na literatura. Regueiro e colaboradores (2015) descreveram o efeito citotóxico em neurônios corticais primários expostos por 7 dias ao DMF ($DL_{50} = 58 \pm 6 \mu\text{M}$). Outro trabalho apresentou as deformidades na cauda e edema de pericárdio encontrados em larvas de *Danio rerio*, 48 h pós-fecundação e exposição ao DMF (13,6 e 4,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). O DMF foi capaz de desregular a expressão de genes responsáveis por manter a viabilidade de minicromossomos e também de genes regulatórios do ciclo celular, que podem resultar em má formação ou estagnação da proliferação, e consequente morte celular. Essa desregulação gênica foi ainda mais acentuada quando os animais foram expostos ao DMF e ao difenoconazol simultaneamente (FAN et al, 2021b).

Um trabalho investigou resíduos de agrotóxicos em 3 espécies vegetais comumente utilizadas na medicina tradicional chinesa. O CBZ (0,5 – 284,3 mg/kg) foi encontrado em mais de 87% de 313 amostras analisadas por CLUE-EM/EM (XIAO et al, 2019). Outro estudo investigou os rizomas de uma das espécies vegetais mais conhecidas da medicina chinesa, e em 99 amostras testadas, todas apresentaram resíduos CBZ (0,38 a 343,55 mg/ kg) e 98 apresentaram resíduos de DMF (1,38 a 364,44 mg/ kg) em sua composição (ZHANG et al, 2022). E assim como no Brasil, não há a descrição do LMR dessas substâncias para plantas medicinais.

Embora, o DMF esteja classificado atualmente como pouco tóxico, a comunidade científica ainda não aprofundou as investigações a cerca desse tóxico, mas trabalhos recentes têm demonstrado o potencial tóxico do DMF no desenvolvimento embrionário, apresentando ainda um efeito sinérgico quando usado concomitantemente com outro fungicida de outra classe química (FAN et al, 2021b). Até o momento não há dados suficientes na literatura para traçar o perfil toxicológico do DMF associado ao CBZ, que por sua vez possua alto grau de toxicidade.

Levando em consideração que os humanos são muito maiores do que os organismos cujos agrotóxicos têm como alvo, não é esperado que pequenas quantidades dessas substâncias causem malefícios a saúde. No entanto eles são sim

tóxicos para os humanos. Não apenas em altas doses, caracterizando uma intoxicação aguda, mas também em pequenas doses, como nas misturas de agrotóxicos. Essa exposição de longa duração, de baixas doses, pode causar câncer, doenças neurodegenerativas, distúrbio reprodutivos e de desenvolvimento, entre outros (HERNÁNDEZ et al, 2013; GOLÇALVES et al, 2020; SILVA, SILVA, ROSSETO; 2022).

Como os agrotóxicos são frequentemente utilizados em vários tipos de plantações, seus resíduos podem ser encontrados nos alimentos e na água. Essa exposição diária, proveniente da alimentação, associada ao uso também recorrente de plantas medicinais e derivados, podem gerar efeitos tóxicos sinérgicos desconhecidos. Pois apesar de muitos trabalhos na literatura descreverem os efeitos tóxicos de diferentes IAs, a verdade é que há pouca informação acerca do efeito gerado pela interação de múltiplas substâncias (HERNÁNDEZ et al, 2013; GOLÇALVES et al, 2020).

Diante dos dados de atividade farmacológica evidenciados, pode-se afirmar que as tinturas de *M. glomerata* ofertadas no Estado do Rio de Janeiro carecem de uma padronização da matéria-prima vegetal ou do cumprimento do processo extrativo oficial descrito na FFFB. Associado ao fato de que amostras comerciais têm apresentado resíduos de agrotóxico inadequados em sua composição, levanta-se a necessidade da melhoria das fiscalizações por intermédio de órgãos de vigilância.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que o modelo experimental *in vitro* para quantificar o percentual de inibição da produção de NO é uma ferramenta promissora para ser utilizada como método de controle de qualidade de atividade farmacológica de tinturas de *M. glomerata* 10%. Associado a isso, foram estabelecidos valores de CMR nos ensaios *in vivo* que poderão ser utilizados como parâmetros em análises de doseamento com fins de controle de qualidade. Garantindo assim, a efetividade terapêutica a partir dos valores de CMR encontrado em métodos analíticos.

O presente trabalho também estabeleceu valores de resíduo seco que poderão ser utilizados como padrão de qualidade para unidades básicas de produção. Além do mais, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLUE-EM/EM para analisar 268 resíduos de agrotóxicos na matriz de tintura de *M. glomerata* 10% conforme requisitos descritos nas RDCs 26 de 2014 e 105 de 2016.

As análises comparativas das TCs evidenciaram um desvio de qualidade acentuado nos produtos que estão sendo ofertados para a população do Rio de Janeiro. Além da ausência de atividade terapêutica, foi encontrado resíduos de fungicidas em algumas amostras. Esses dados demonstram claramente a necessidade da padronização das matérias-primas e dos processos extrativos, bem como uma maior atuação das agências regulatórias.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A.A.K.; ABOU-DONIA, M.A. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. **Food Chemistry**. v.72, p.439-445, 2001.
- ABREU, A.S.; SANTOS, A.R.; KAISER, C.R. Determinação de Cumarina em Extratos de Guaco Comercial: Um Estudo de Caso sobre o Controle de Qualidade de Fitoterápicos. **Revista Fitos**. v.3, n.1, p.60-66, 2007.
- AGRA, L.C.; et al. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.780, p.232-242, 2016.
- AGUIAR, J.L.N. de. **Contribuições para a avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos no Brasil**. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2014. 213f.
- ALVARENGA; F.C.R.; et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, p.442-448, 2009.
- ALMEIDA, C. de L.; et al. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. **International Journal of Mass Spectrometry**. v.418, p.162–172, 2017.
- ALMEIDA, F. S. de. **A produção agroecológica de mikania glomerata spreng. Em assentamentos de reforma agrária do planalto norte e litoral norte de Santa Catarina**. 2019. 115f. Tese (Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- AMORIM, H. F. **Apresentação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápica na Cidade do Rio de Janeiro: Uma Perspectiva Longitudinal**. 2012. 56f. Dissertação (Pós-graduação *Lato sensu* em Gestão da Inovação de Fitomedicamentos). Instituto de Tecnologia de Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
- AMORIM, H.F. - **Farmácia Viva do Município do Rio de Janeiro. O acesso do usuário do SUS às plantas medicinais e fitoterápicos no município do Rio de Janeiro**. Palestra na mesa redonda: Fitoterapia, regulamentação e serviços de saúde. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, Juazeiro-BA. 17 de novembro de 2015.
- ANDRADE, de D.; et al. Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 40, n. 2, p. 250-254, 2007.
- BASF. Badische Anilin & Soda Fabrik. **Bula Forum®**. 2020. Disponível em:< https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/forum0720.pdf> Acesso em 17 de out. 2022.

BASTOS, L.H.P.; et al. Uso de Espectrometria de Massa Sequencial Para Avaliar Resíduos de Agrotóxicos em Amostras de Alimento Animal. **Revista Analytica**. v.64, p.79-88, 2013.

BERTOL, G.; COBRE, A.F.; PONTAROLO, R. Differentiation of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* Species Through Mid-infrared Spectroscopy and Chemometrics Guided by HPLC-DAD Analyses. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 31, p.442-452, 2021.

BESIL, N.; et al. Evaluation of different QuEChERS procedures for pesticide residues determination in *Calendula officinalis* (L) inflorescences. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. 2017, doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.09.001>>. Acesso em 23 out. 2018.

BORGHI, A.A., ALMEIDA, C. de L., SAWAYA, A.C.H.F. Damage and drying modify the composition of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* leaves. **Brazilian Journal of Phamacognosy**. v. 29, p.793–797, 2019.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de julho de 1989, Seção 1, p.11459.

BRASIL. Decreto-lei nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, janeiro 2002, Seção 1, p.1.

BRASIL. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – PMNPC**. Resumo Executivo. Brasília: Ministério da Saúde. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 67, de 8 de outubro de 2007 – “**Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinas para Uso Humano em farmácias**”.

Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0067_08_10_2007.htm> . Acesso em: 28 de maio de 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 87, de 21 de novembro de 2008. **Diário Oficial da União**, nº 228, de 24 de novembro de 2008, Seção 1, p. 58 e 59.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 140p. Brasília: ANVISA, 2009a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 71, de 22 de dezembro de 2009. “**Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos**”. 2009b. Disponível em:<
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0071_22_12_2009.html#:

~:text=Estabelece%20regras%20para%20a%20rotulagem,o%20inciso%20IV%20do%20art.>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 5ª ed., v.2, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 126p. Brasília: Anvisa, 1ª ed. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 18, de 3 de abril de 2013 – “**Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)**”. Disponível em:<
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0018_03_04_2013.pdf>. Acesso em: 28 maio. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2014a. **Plantas de Interesse ao SUS - RENISUS. Portal de Saúde SUS**. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 07 jun. 2021. 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Introdução ao uso das plantas medicinais em Petrópolis**. Palácio Itaboraí, 1ª ed., v.1, 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 26, de 13 de maio de 2014 – “**Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**”. 2014c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – nº 4, de 18 de junho de 2014 – “**Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**”. Disponível em:<
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+%282%29.pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6>>. Acesso em: 20 out. 2018. 2014d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID (Versão V)**. Brasília, 2015a.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2015b. Disponível em:<<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Fundação Oswaldo Cruz. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre o impacto dos agrotóxicos a saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo. Editora: Expressão Popular. 628f., 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2016a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - nº 105, de 31 de agosto de 2016b. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1º set. 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Mikania glomerata* (GUACO)**. 94f. Brasília, 2018a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - 235, de 21 de junho de 2018– “**Dispõe sobre alterações e inclusões de controle de qualidade no registro e pós-registro de medicamentos dinamizados, fitoterápicos, específicos e produtos biológicos**”. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0235_21_06_2018.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2022. 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília. Editora: MS, v.1, 193f. 2018c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 6ª ed., v.2, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Análise de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos**. Brasília. 3 ed. 2019b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - 301, de 21 de agosto de 2019– “**Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos**”. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/%286%29RDC_301_2019_COMP.pdf/7d991c04-e7a1-4957-aed5-3689c62913b2>. Acesso em: 27 abr. 2021. 2019c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 6ª ed., v.1, 2019d.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário de Fitoterápicos**. 223p. Brasília: ANVISA, 2ª ed., 2021a.

BRASIL. Ministério d Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52 de março de 2021. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de março de 2021, ed.55, seção 1, p.10. 2021b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT): Clórpifós**. 2021c. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=45>. Acesso em: 02 maio 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consultas/Medicamentos (Guaco e *Mikania glomerta*)**. Acesso em 08 jul. 2022a

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. SINAN NET- BRASIL. TABNET. **Intoxicação exógena 2016 a 2022**. Disponível em:< <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/Intoxbr.def>>. Acesso em 19 jul. 2022. 2022b

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Carbendazim: ANVISA concluiu processo de reavaliação e mantém o banimento**. Disponível em:< <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/carbendazim-anvisa-concluiu-processo-de-reavaliacao-e-mantem-o-banimento>>. Acesso em 19 set. 2022. 2022c.

BRITO, P.F. de; GOMIDE, M.; CÂMARA, V. de M. Agrotóxicos e saúde: realidade e desafios para mudança de práticas na agricultura. **Revista de Saúde Coletiva**. v.19, n.1, p.207-225, 2009.

BRITO, T.M. de; et al. Anti-Inflammatory Activity and Chemical Analysis of Different Fractions from *Solidago chilensis* Inflorescence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2021, p.1-12, 2021.

BUDEL, J.M.; et al. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.2B, p.545-552, 2009.

CAMPOS, G.L.R.C.; NASCIMENTO, L.M.F. do; SILVA, M.T. da. Medicamentos Fitoterápicos mais comercializados de 2020 a 2021 em uma drogaria situada em Manaus – AM – Brasil. **Research, Society and Development**. v. 10, n.15, p.1-7, 2021.

CARMO, J.dos; NOGUEIRA. J.M. da R.; SILVA, L.O.P.da. A importância do controle de qualidade microbiológico em produtos fitoterápicos e plantas medicinais. **Research, Society and Development**. v.11, n.10, p.1-13, 2022.

CARNEIRO, A.de A. **Avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos de interesse para o suS**. 123f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2017.

CARVALHO, A.C.B; et al. The brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**. v.212, p.29–35, 2018.

CAZARIN, K.C.C., CORRÊA, C. L., ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.40, n.3, 2004.

CEUA. Comissão de Ética no Uso de Animais. **Princípios dos 3 R's**. Universidade Federal de São Paulo, 2015. Disponível em:< <https://ceua.unifesp.br/projetos/material-de-apoio/principios-dos-3rs>>. Acesso em: 28 de out. 2022.

CFF. Conselho Feral de Farmácia. **Guia Prático do Farmacêutico Magistral**. Brasília, 2017. 16f. Disponível em:<

https://www.cff.org.br/userfiles/file/guia%20pr%C3%A1tico%20do%20farmac%C3%AAutico%20magistral_08dez2017_WEB.pdf>. Acesso em: 10 de out. 2022.

COSTA, V.C. de O.; et al. Comparison of the Morphology, Anatomy, and Chemical Profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. **Planta Medica**. v.84, n.8, p.191-200, 2018.

CZELUSNIAK, K.E.; et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.2, p.400-409, 2012.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**. v.25, n.6, 2002.

DAVID, J.P.L.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**. v.16, n.9-10, p.71-76, 2004.

DELLA PASQUA, C.S.P.; et al. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacoly**. v.231, p.50-56, 2019.

DRESCH, R.R.; CARVALHO, J.G.de. Análise dos Programas de Fitoterapia e de Farmácias Vivas no Sistema Único de Saúde – SUS. **Revista Fitos**. s.1, p. 22-34, 2022.

DIAS, J. V.; et al. Simultaneous determination of pesticides and mycotoxins in wine direct injection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. **Food Chemistry**. v.293, p.83-91, 2019.

DOW AGROSCIENCES INDUSTRIAL LTDA. **Bula Lorsaban® 480**. 2018.
Disponível em:<

<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/lorsban480br260218.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2018.

DURGNAT, J.M.; et al. Quality and safety assessment of ginseng extracts by determination of the contents of pesticides and metals. **Food Additives and Contaminants**. v.22, n.12, p.1224–1230, 2005.

EL-HAGGAR, R.; AL-WABLI, R.I. Anti-Inflammatory Screening and Molecular Modeling of Some Novel Coumarin Derivatives. **Molecules**. v.20, p. 5374-5391, 2015.

FARIA, S. de M, et al. Evaluation of the microbiological contamination in herbal medicines. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.71, n.3, p.549-56, 2012.

FAN, R.; et al. Individual and synergistic toxic effects of carbendazim and chlorpyrifos on zebrafish embryonic development. **Chemosphere**. v.280, 2021a.

FAN, R.; et al. Combined Developmental Toxicity of the Pesticides Difenconazole and Dimethomorph on Embryonic Zebrafish. **Toxins**. v.13, n.12, p.854, 2021b.

FERREIRA, L.C.R.P.; et al. **Percepção ambiental dos agricultores quanto ao uso de agrotóxicos nas hortas comunitárias, Teresina, PI**. V Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Belo Horizonte/MG – 24 a 27/11/2014. Disponível em:<<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2014/VII-030.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2018.

FERREIRA, G.D. **Desenvolvimento de tintura de mulungu (*erythrina velutina*) para a Farmácia Escola Manoel Casado de Almeida**. 2018. 43f. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba, 2018.

FIERRO, I.M.; et al. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v.66, p.19-24, 1999.

FRANCO, D.P.; et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**. v. 44, n.2, p.180-197, 2021.

FREITAS, T.P.; et al. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. And *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) Extracts on Pulmonary Inflammation and Oxidative Stress Caused by Acute Coal Dust Exposure. **Journal of Medicinal Food**. v.11, n.4, p761-766, 2008.

GAO, R.; et al. Protective effect of chlorogenic acid on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in dairy mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis** v.124, p.178–182, 2018.

GARCIA, M.S.; et al. Reproductive toxicity in male juvenile rats: Antagonistic effects between isolated agrochemicals and in binary or ternary combinations. **Ecotoxicology and Environmental Sfty**. v. 209, 2021.

GINDRI, A.L.; LAPORTA, L.V.; SANTOS, M.R. Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.3, p.563-570, 2012.

GONÇALVES, I.F.S.; et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environmental Science and Pollution Research*. v.27, p.10185-10204, 2020.

GOUVÊA, M.M., et al. Decontamination of *Mikania glomerata* Leaves by Gamma Irradiation: Coumarin Determination by HPLC-DAD, Microbiological Control and Genotoxicological Studies. **Planta Medica**. v.84, n.1, p.65-72, 2018.

GREEN, L.C.; et al. Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v.126, p.131-138, 1982.

GUIMARÃES, E.C.B.T.; et al. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para o Controle Químico da Qualidade de Fitoterápicos à Base de Extrato Seco de Alcachofra. **Revista Fitos**. v.2, p.64-77, 2007.

HEINZEN, H. **New Advances In The Determination of Pesticide Residue in Medicinal Plants**. Palestra In: XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. Curitiba-PR. 9 de agosto de 2017.

HERNÁNDEZ, A.F.; et al. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. **Toxicology**. v.307, p.136-145, 2013.

HOSTETTMANN, H.K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 2ª ed. São Carlos. UFSCar, 2003.

ISHITA, I.J.; et al. Coumarins from *Angelica decursiva* inhibit lipopolysaccharide induced nitrite oxide production in RAW 264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**. 2015, doi: <10.1007/s12272-015-0668-6>. Acesso em: 29 out. 2018.

JANG, H.L.; et al. Synthesis of tricyclic fused coumarin sulfonates and their inhibitory effects on LPS-induced nitric oxide and PGE2 productions in RAW 264.7 macrophage. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, p.571–575, 2014.

JUSTO, O.R.; et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15, n.390, 2015.

LEAL-COSTA, M.V.; et al. Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ. **Revista Fitos**. v.12, n.2, p. 127-134, 2018.

LI, Z.; et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of IMMLG5521, a coumarin derivative. **International Immunopharmacology** v.17, p.400–403, 2013.

LIY, P.M; et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cell. **Experimental Biology and Medicine**. v.245, n.22, p.2399-2406, 2021.

LAU, H, et al. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Celery Leaf and Stem Extracts in LPS-Induced RAW 264.7 Cells Using Nitric Oxide Assay and LC-MS Based Metabolomics. **Current Issues in Molecular Biology**. v.43, n.3, p.1876–1888, 2021.

LOPES, A.C.; et al. Controle de qualidade de ervas medicinais comercializadas em Santo Antônio de Jesus-BA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. V.15, n.3, p.221-235, 2019.

LU, X.Y.; et al. Coumarin sulfonamides derivatives as potent and selective COX-2 inhibitors with efficacy in suppressing cancer proliferation and metastasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2016, doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.037>>. Acesso em: 29 out. 2018.

MALINOWSKA, E.; JANKOWSKI, K. Pesticide residues in some herbs growing in agricultural areas in Poland. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.187, p.775, 2015.

MARIA, C.A.B. de; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**. v.27, n.4, p.586-592, 2004.

MARTINS, J.N. **Agrotóxicos em feijão: otimização, validação e aplicação de método analítico multirresíduo**. 92f. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação *Lato sensu* em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

MELO, J.G. de; et al. Quality of products made from medicinal plants commercialized in Brazil: horsechestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), and gotu kola (*Centella asiatica* (L.) Urban. **Acta Botânica Brasileira**. v.21, n.1, 2007.

MELO, L.V. de; SAWAYA, A.C.H.F. Stability of hydroalcoholic extracts of two species of guaco; *Mikania glomerata* SPRENG. and *Mikania laevigata* SCHULTZ. (Asteraceae), by UHPLC-MS. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.56, e17194, 2020

MOREIRA, A.F.C.; et al. Kaurenoic acid determination in extract, tincture and syrup of *mikania glomerata* by hplc-qqq-ms/ms. **Química Nova**. v. 43, n. 5, p.632-635, 2020.

MOURA, R.S. de; et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.56, p.249-256, 2002.

MOURÃO, V.B.; et al. Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.29, n.1, p.30-37, 2014.

MUYLAERT, F.F. **Avaliação da atividade antialérgica e toxicidade da pele de espécies de peixes-porco empregados na medicina tradicional brasileira por populações caiçaras**. 114f. Tese (Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

NAPIMOGA, M.H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.62, p.809-820, 2010.

NASCIMENTO, V.T.; et al. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.7, n.3, p.56-64, 2005.

NJOYA, E.M.; et al. Phytochemical analysis with free radical scavenging, nitric oxide inhibition and antiproliferative activity of *Sarcocephalus pobeguinii* extracts. **BCM complementary medicine and therapies**. v.17, n.1, p.199, 2017.

OGAVA, S.E.N.; et al. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, p.58-62, 2003.

OLIVEIRA, D.M. de; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**. v.34, n.6, p.1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, P.C., et al. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**. v.135, n.2, p.393-398, 2011.

OLIVEIRA, L.B. de B. **Avaliação microbiológica de xaropes fitoterápicos contendo mikania glomerata s., comercializados no município de Santo Antônio de Jesus – BA**. 2017. 47f. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, BA. 2017.

OSHIRO, M. C.; et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Visa Em Debate**. v.4, n.4, p.116-122, 2016.

OSORIO, A. de C. **Controle de Qualidade do Extrato Fluido e da Tintura de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel)**. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PARK, S. M. et al. Combination of *Pelargonium sidoides* and *Coptis chinensis* root inhibits nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n.20, p.1-13, 2018.

PEREIRA, A.M.S.; et al. Seasonal Variation in Coumarin Content *Mikania glomerata*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. v.7, n.2, 2000.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C. (orgs.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente** [online]. Rio de Janeiro. Editora: Fiocruz, p. 21-41, 2003.

PIGNAT, W.A.; MACHADO, J.M.H.; CABRAL, J.F. Major rural accident: the pesticide "rain" case in Lucas do Rio Verde city – MT. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.12, n.1, p.105-114, 2007.

PUBCAM. **Chlorogenic acid**. U.S. National Library of Medicine, 2017. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorogenic_acid#section=Top>. Acesso em: 21 nov. 2018.

PUBCAM. **3,5-Dicaffeoylquinic acid**. U.S. National Library of Medicine, 2018.

Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isochlorogenic_acid_A#section=Top>.

Acesso em: 21 nov. 2018.

QIN, Y.; et al. Multi-residue Method for Determination of Selected Neonicotinoid Insecticides in Traditional Chinese Medicine Using Modified Dispersive Solid-phase Extraction Combined with Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**. v.31, p. 823-830, 2015.

QUINTÃO, L.F. **Validação e implementação de método analítico multirresíduo para determinação de agrotóxicos em melancia por CLUE-EM/EM**. 84f. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação *Lato sensu* em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Saúde. Subsecretaria de Atenção Primária, Vigilância e Promoção da Saúde. **Que tal um chazinho? Guia prático de plantas medicinais**. p.1-43, 2015.

RIO DE JANEIRO (Município). **Prefeitura fornece medicamentos naturais a pacientes da rede de Atenção Primária**. 2016. Disponível:

<<http://www.rio.rj.gov.br/web/guest/exibeconteudo?id=6464011>>. Acesso em 08 jul. 2022.

ROCHA, L.O.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C.L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas - Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.40, p.521-527, 2004.

ROCHA, L.; LUCIO, E.M.A., FRANÇA, H.S., SHARAPIN, N (*in memoriam*). *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. s.18, p. 744-747, 2008.

RODRIGUES, M.V.N.; et al. GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.18, n.1, p.135-142, 2007.

REGUEIRO, J.; et al. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. **Environmental Research**. v.140, p. 37-44, 2015.

SANTE, European Commission. **Guidance Document on Analytical Quality Control and validation Procedures for Pesticide residues Analysis in Food and Feed – Document n° SANTE/12682/2019**. 52f. Europa, 01 Jan. 2020.

SANTOS, R.R. dos. Comparação de sistemas de cultivo convencional e orgânico na produção de cumarina em *Mikania glomerata* Spreng. (**Asteraceae**) e avaliação de genotoxicidade. 2018. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2018.

SESA. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Intoxicação aguda por agrotóxicos: Atendimento inicial do paciente intoxicado**. 120f., 2018.

SILVA, M.I.G.; et al. The use of herbal medicines in the family health care units in Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.455-462, 2006.

SILVA, M. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substância sobre formas taquizoítas de *Toxiplasma gondii* com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito**. 2009. 46f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

SILVA, L.S. e. ***Mikania glomerata* Sprengel (Guaco): obtenção do extrato seco e determinação do nível de cumarina por espectrofotometria**. 63f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SILVA, R.C., BARROS, K.A., PAVÃO, A.C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química Nova**. v.37, n.8, 2014.

SILVA, M.R. da, et al. Coumarin solubilization in aqueous medium and determination of the its activity antibacterial. **Santa Maria**, v. 42, n.2, p. 195-201, 2016.

SILVA, C.B. da, et al. **Controle microbiológico de produto fitoterápico não estéril**. Anais da III semana de estudos farmacêuticos e II mostra científica de farmácia da FACENE, p. 44, 2019.

SILVA, A.A. da; SILVA, C.L. da; ROSSETO, L.P. Pesticides in medicinal plants used in the production of phytotherapy: a literature review. **Tópicos Especiais em Ciências da Saúde: Teoria, Métodos e Práticas**. v.3, p.35-51, 2022.

SIRIVASTANA, P.; et al. Synthesis, antiinflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. **Bioorganic Chemistry**. 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.004>. Acesso em 08 ago. 2018.

SOUZA, L.S. de; et al. chemical evaluation and antioxidant activity of *Plantago sp*, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Mikania glomerata* Sprengel e *Mentha sp* cultivated in different parts of Espírito Santo State. **Revista IFES Ciência**. v.6, n.2, p.228-241, 2020.

SOUZA, J.O.; et al. *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae): seu uso terapêutico e seu potencial na Pandemia de COVID-19. **Revista Fitos**. v.16, n.2, p.270-276, 2022.

SOUZA, D.B.da C.; PORFIRO, C.A.; FILHO MENEZES, A.C.P.de. Bronchodilator action of *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) in patients with asthma. **Generalist Pharmacy Journal**, v.4 n.1, p. 1-23, 2022.

TAHA, S.M.; GADALLA, S.A. Development of an Efficient Method for Multi Residue Analysis of 160 Pesticides in Herbal Plant by Ethyl Acetate Hexane Mixture with

- Direct Injection to GC-MS/MS. **Talanta**. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.080>. Acesso em 29 out. 2018.
- TOLEDO, A.C.; et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.
- TONDER, A.V.T.; JOUBERT, A.M.; CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**. v.8, n.47, 2015.
- TRIPATHY, V.; et al. Validation of a QuEChERS-based gas chromatographic method for analysis of pesticide residues in *Cassia angustifolia* (senna). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 2016. Doi: 10.1080/03601234.2016.1170544. Acesso em 28 out. 2018.
- UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. **Recordista em liberações, governo Bolsonaro autoriza 51 novos agrotóxicos apenas em julho**. 2021. Disponível em: <<https://manuelzao.ufmg.br/recordista-em-liberacoes-governo-bolsonaro-autoriza-51-novos-agrotoxicos-apenas-em-julho/>>. Acesso em 5 de jun. 2022.
- USA. United States of America. Agency for Toxic Substances and disease Registry. **ToxGuide for Aldrin/Dieldrin**. 2002. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-1.pdf>>. Acesso em 23 out. 2018.
- VIEIRA, R.F., et al. Chemical and phylogenetic characterization of Guaco (*Mikania laevigata*; *M. glomerata*) germplasm. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.90, 2020.
- WANG, Y.; et al. Levels and Risk of Pesticide Residues in Chinese Herbal Medicines. **Frontiers in Pharmacology**. v.12, p. 1-11, 2021.
- WHO. World Health Organization. **Who Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. WHO Library, Geneva, 2013.
- WHO. World Health Organization. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. WHO Library, Geneva, Switzerland, 2007.
- XIAO, J.; et al. Analysis of exposure to pesticide residues from Traditional Chinese Medicine. **Journal Hazardous Materials**. v.5, n.65, p.857-867, 2019
- YUAN, Y.; et al. Chlorogenic acid ameliorated concanavalin A-induced hepatitis by suppression of Toll-like receptor 4 signaling in mice. **International Immunopharmacology**. v.44, p.97-104, 2017.

ZHANG, D.; et al. Detection and Risk Assessments of Multi-Pesticides in Traditional Chinese Medicine Chuanxiong Rhizoma by LC/MS-MS and GC/MS-MS. **Molecules**. v.27, n.3, p. 622, 2022.

ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.W.; BICCHI, C. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. **Journal of Chromatography A**. v.985, p.159–166, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Valores encontrados para r e R² – Continua

COMPOSTOS	r	R ²	COMPOSTOS	r	R ²
3-OH-Carbofurano	0,9969	0,9938	Ciprodinil	0,9984	0,9969
Acetamiprido	0,9992	0,9984	Ciromazina	0,9935	0,9870
Alacloro 1	0,9960	0,9921	Clodimeforme	0,9943	0,9887
Alacloro 2	0,9878	0,9757	Clomazona	0,9975	0,9950
Alanicarbe	0,9909	0,9818	Clorantraniliprole	0,9961	0,9921
Aldicarbe	0,9935	0,9870	Clorbromurom	0,9902	0,9804
Aldicarbe sulfona	0,9990	0,9981	Clorfenvinfós	0,9950	0,9899
Ametrina	0,9973	0,9946	Clorfluazurom	0,9890	0,9782
Amicarbazona	0,9979	0,9958	Cloroxurom	0,9992	0,9985
Aminocarbe	0,9987	0,9974	Clotianidina	0,9886	0,9773
Atrazina	0,9968	0,9936	Coumafós	0,9962	0,9925
Azaconazol	0,9997	0,9993	Cresoxim metílico	0,9984	0,9968
Azametifós	0,9999	0,9997	Daimurom	0,9988	0,9975
Azinfós etílico	0,9935	0,9871	Demeton-S-metílico	0,9923	0,9846
Azinfós metílico	0,9975	0,9950	Desmedifam	0,9975	0,9949
Azoxistrobina	0,9983	0,9966	Diazinona	0,9976	0,9952
Benalaxil	0,9991	0,9982	Diclofluanida	0,9913	0,9827
Bendiocarbe	0,9980	0,9960	Diclorvós	0,9946	0,9892
Benomil	0,9995	0,9991	Dicrotofós	0,9961	0,9923
Benzoato de emamectina	0,9861	0,9724	Dietofencarbe	0,9994	0,9987
Bifenazate	0,9905	0,9811	Difenoconazol	0,9968	0,9935
Bitertanol	0,9861	0,9723	Difenoxuron	0,9943	0,9887
Boscalida	0,9958	0,9916	Diflubenzuron	0,9886	0,9773
Bromuconazol	0,9952	0,9904	Dimetenamida	0,9986	0,9971
Bupirimato	0,9982	0,9965	Dimetoato	0,9994	0,9988
Buprofezina	0,9995	0,9990	Dimetomorfe	0,9988	0,9976
Butacloro	0,9939	0,9879	Dimoxistrobina	0,9985	0,9969
Butocarboxim	0,9874	0,9750	Diniconazol	0,9917	0,9835
Butocarboxim sulfóxido	0,9993	0,9985	Dioxacarbe	0,9982	0,9965
Cadusafós	0,9969	0,9939	Dissulfotom	0,9947	0,9894
Carbaril	0,9966	0,9932	Diurom	0,9972	0,9944
Carbendazim	0,9982	0,9963	DMSA	0,9903	0,9807
Carbetamida	0,9994	0,9988	DMST	0,9990	0,9980
Carbofurano	0,9992	0,9984	Dodemorfe	0,9993	0,9985
Carboxina	0,9963	0,9926	Dodine	0,9960	0,9920
Carbutilato	0,9992	0,9983	Epoxiconazol	0,9993	0,9987
Carfentrazona etílica	0,9967	0,9934	Espinetoram	0,9907	0,9814
Carpropamida	0,9971	0,9941	Espinosade A	0,9955	0,9911
Ciazofamida	0,9961	0,9922	Espinosade D	0,9951	0,9903
Cicloxidine	0,9955	0,9911	Espirodiclofeno	0,9990	0,9980
Ciflufenamida	0,9964	0,9929	Espiromesifeno	0,9953	0,9906
Cimoxanil	0,9844	0,9691	Espirotetramato	0,9983	0,9966
Ciproconazol	0,9932	0,9864	Espiroxamina	0,9981	0,9961

APÊNDICE A - Valores encontrados para r e R² – Continuação

COMPOSTOS	r	R ²	COMPOSTOS	r	R ²
Esprocarbe	0,9998	0,9996	Fosfamidona	0,9965	0,9931
Etidimurom	0,9980	0,9961	Fosmete	0,9999	0,9998
Etiofencarbe	0,9980	0,9961	Foxim	0,9981	0,9963
Etiofencarbe sulfona	0,9981	0,9962	Fuberidazol	0,9981	0,9962
Etiofencarbe sulfóxido	0,9992	0,9985	Furalaxil	0,9986	0,9972
Etiona	0,9989	0,9978	Furatiocarbe	0,9990	0,9980
Etiprole	0,9968	0,9937	Halofenosídeo	0,9937	0,9874
Etimol	0,9976	0,9953	Heptenofós	0,9964	0,9928
Etobenzanida	0,9930	0,9860	Hexaconazol	0,9971	0,9942
Etopenprox	0,9975	0,9951	Hexitiazox	0,9808	0,9619
Etofumesato	0,9972	0,9943	Imazalil	0,9990	0,9980
Etoprop (Etoprofós)	0,9986	0,9972	Imazapique	0,9978	0,9956
Etoazol	0,9991	0,9983	Imazapir	0,9955	0,9911
Etrinofós	0,9893	0,9787	Imazaquim	0,9965	0,9930
Famoxadona	0,9929	0,9859	Imazetapir	0,9990	0,9980
Fenamidona	0,9975	0,9951	Imazosulfurom	0,9919	0,9839
Fenamifós	0,9961	0,9923	Imibenconazol	0,9949	0,9899
Fenarimol	0,9864	0,9730	Imidacloprido	0,9976	0,9953
Fenazaquina	0,9941	0,9882	Indoxacarbe	0,9973	0,9947
Fenbuconazol	0,9974	0,9947	lprovalicarbe	0,9988	0,9977
Fenhexamida	0,9928	0,9857	Isocarbamida	0,9989	0,9979
Fenmedifam	0,9937	0,9874	Isofenofós	0,9918	0,9836
Fenobucarbe	0,9964	0,9928	Isoprocarbe	0,9985	0,9970
Fenoxicarbe	0,9985	0,9969	Isoprotiolona	0,9960	0,9920
Fenpiroximato	0,9974	0,9948	Isoproturom	0,9983	0,9967
Fenpropatrina	0,9838	0,9678	Isoxaflutol	0,9829	0,9662
Fenpropidina	0,9992	0,9984	Isoxationa	0,9983	0,9965
Fenpropimorfe	0,9981	0,9963	Lactofem	0,9960	0,9920
Fentiona sulfóxido	0,9992	0,9984	Linurom	0,9860	0,9721
Fentoato	0,9976	0,9952	Malationa	0,9997	0,9994
Fenurom	0,9987	0,9974	Mandipropamida	0,9982	0,9964
Flonicamida	0,9948	0,9896	Mefenacete	0,9991	0,9982
Fluazifope-p-butílico	0,9982	0,9965	Mefosfolam	0,9961	0,9923
Flufenacete	0,9996	0,9992	Mepanipirim	0,9974	0,9947
Flufenoxurom	0,9939	0,9878	Mepronil	0,9981	0,9962
Fluoxastrobina	0,9986	0,9973	Mesotriona	0,9914	0,9828
Fluquinconazol	0,9878	0,9758	Metalaxil	0,9981	0,9961
Flusilazol	0,9996	0,9992	Metalaxil M	0,9978	0,9955
Flutolanil	0,9989	0,9977	Metamidofós	0,9972	0,9944
Flutriafol	0,9993	0,9985	Metconazol	0,9983	0,9966
Fluxaproxade	0,9897	0,9796	Metidationa	0,9995	0,9990
Forclorfenurom	0,9992	0,9983	Metiocarbe	0,9991	0,9983
Fosalona	0,9985	0,9969	Metiocarbe sulfona	0,9989	0,9978

APÊNDICE A - Valores encontrados para r e R² – Continuação

COMPOSTOS	r	R ²	COMPOSTOS	r	R ²
Metiocarbe sulfóxido	0,9988	0,9976	Procloraz	0,9974	0,9948
Metobromurom	0,9987	0,9975	Profenofós	0,9957	0,9914
Metomil	0,9992	0,9985	Prometom	0,9992	0,9984
Metoxifenosida	0,9984	0,9968	Prometrina	0,9990	0,9979
Metoxurom	0,9962	0,9923	Propargito	0,9983	0,9966
Metrafenona	0,9950	0,9900	Propazina	0,9992	0,9983
Metroprotrina	0,9971	0,9943	Propiconazol	0,9964	0,9928
Metsulfurom metílico	0,9986	0,9972	Propizamida (Pronamida)	0,9926	0,9853
Mevinfós	0,9947	0,9894	Propoxur	0,9956	0,9913
Miclobutanil	0,9993	0,9986	Proquinazide	0,9925	0,9851
Molinato	0,9914	0,9828	Protioconazol	0,9806	0,9616
Monalida	0,9946	0,9893	Quinalfós	0,9966	0,9932
Monocrotofós	0,9953	0,9907	Quinoxifem	0,9984	0,9967
Monolinurom	0,9951	0,9902	Quizalofope etílico	0,9907	0,9814
Neburom	0,9994	0,9988	Rotenona	0,9971	0,9942
Nitenpiram	0,9907	0,9815	Sebutilazina	0,9984	0,9968
Norflurazom	0,9972	0,9945	Sidurom	0,9988	0,9977
Nuarimol	0,9845	0,9692	Simazina	0,9899	0,9800
Ometoato	0,9986	0,9971	Simetrina	0,9970	0,9940
Oxadiargil	0,9892	0,9784	Sulfentrazona	0,9882	0,9765
Oxadixil	0,9982	0,9965	Tebuconazol	0,9954	0,9908
Oxamil	0,9983	0,9967	Tebufenosida	0,9969	0,9938
Oxamil oxima	0,9991	0,9981	Tebufenpirade	0,9958	0,9916
Oxicarboxina	0,9981	0,9962	Tebupirinfos	0,9984	0,9968
Paclobutrazol	0,9987	0,9973	Tebutiuro	0,9994	0,9987
Pencicurom	0,9986	0,9972	Temefós	0,9948	0,9895
Penconazol	0,9980	0,9960	Tepraloxidim 1	0,9885	0,9772
Pendimetalina	0,9916	0,9833	Tepraloxidim 2	0,9989	0,9979
Permetrina	0,9845	0,9692	Terbufós	0,9969	0,9939
Picoxistrobina	0,9983	0,9967	Terbumetom	0,9983	0,9966
Pimetrozina	0,9986	0,9972	Terbutrina	0,9975	0,9951
Piperonil butóxido	0,9987	0,9973	Tetraconazol	0,9966	0,9932
Piraclostrobina	0,9954	0,9909	Tiabendazol	0,9994	0,9989
Pirazofós	0,9986	0,9971	Tiacloprido	0,9982	0,9965
Piridabem	0,9986	0,9972	Tiametoxam	0,9959	0,9919
Piridafentiona	0,9973	0,9946	Tiobencarbe	0,9930	0,9860
Pirifenox	0,9965	0,9929	Tiodicarbe	0,9991	0,9981
Pirimetanil	0,9981	0,9962	Tiofanato metílico	0,9950	0,9900
Pirimicarbe	0,9990	0,9979	Tiofanox	0,9852	0,9705
Pirimicarbe desmetil	0,9984	0,9967	Tiofanox sulfona	0,9977	0,9955
Pirimifós etílico	0,9993	0,9986	Tiofanox sulfóxido	0,9943	0,9886
Pirimifós metílico	0,9993	0,9986	Tolifluanida	0,9963	0,9926
Piriproxifem	0,9989	0,9978	Triadimefom	0,9981	0,9962

APÉNDICE A - Valores encontrados para r e R² – Final

COMPOSTOS	r	R ²	COMPOSTOS	r	R ²
Triadimenol	0,9953	0,9907	Triflumizol	0,9990	0,9979
Triazofós	0,9981	0,9961	Triflumurom	0,9816	0,9636
Triciclazol	0,9978	0,9956	Triflusulfurom metílico	0,9954	0,9907
Triclorfom	0,9983	0,9966	Triticonazol	0,9981	0,9962
Tridemorfe	0,9977	0,9953	Uniconazol	0,9974	0,9949
Trifenmorfe	0,9982	0,9965	Vamidotiona	0,9986	0,9972
Trifloxistrobina	0,9984	0,9968	Zoxamida	0,9925	0,9851

APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão – Continua

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2		COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)		DP	CV (%)	DP	CV (%)
3-OH-Carbofurano	2,8	2,7	3	3	Carbaril	6,1	5,6	4,1	3,9
Acefato	3,1	3	2,1	2,1	Carbendazim	3	2,8	3,9	3,7
Acetamiprido	3,2	3,1	1,3	1,2	Carbetamida	4,6	4,4	4,8	4,9
Acetocloro	11,9	11,5	7,1	7	Carbofurano	3,8	3,5	1,6	1,6
Alacloro 1	7,4	6,8	2,1	2	Carbosulfano	30,2	15,8	16,5	17,6
Alacloro 2	11,3	10	7,6	6,2	Carboxina	4,8	4,7	4,5	4,6
Alanicarbe	9,5	9	7,3	7,7	Carbutilato	5,6	4,7	2,5	2,1
Aldicarbe	8,5	8	6,1	6,3	Carfentrazona etílica	4,2	4,2	3	3,1
Aldicarbe sulfona	3,6	3,4	2,2	2,2	Carpropamida	7,4	7	4	3,8
Ametrina	3,9	3,7	2,4	2,4	Ciazofamida	4,7	4,6	5,2	5,2
Amicarbazona	7,4	7	3,5	3,6	Cicloxiclina	5,6	5,8	3,8	4,1
Aminocarbe	4,8	4,6	1,9	1,8	Ciflufenamida	4,5	4,1	4,3	4
Atrazina	4,1	4,1	4,6	4,5	Cimoxanil	8,2	8,1	8,3	8,3
Azaconazol	3,2	3,1	2,7	2,6	Ciproconazol	11,8	11,8	5,7	5,2
Azametifós	2,6	2,4	2,8	2,7	Ciprodinil	5,2	5,1	2,7	2,7
Azinfós etílico	5,9	5,4	4,8	4,7	Ciromazina	5,3	4,9	5,5	5,4
Azinfós metílico	6,8	6,7	5,2	4,8	Clodimeforme	4,4	4,2	2,6	2,4
Azoxistrobina	3,9	3,5	3,7	3,5	Clomazona	2,6	2,5	3,1	3,1
Benalaxil	1,9	1,8	1,8	1,8	Clorantraniliprole	6,6	6,4	3,4	3,4
Bendiocarbe	3,3	3,1	2,4	2,4	Clorbromurom	7	6,4	5,5	5,7
Benfuracarbe	20,9	18,5	12,6	12,9	Clorfenvinfós	3,2	2,9	4,4	4,3
Benomil	2	1,9	2,6	2,5	Clorfluazurom	9,7	9,2	9,4	9,7
Benzoato de emamectina	9,2	8,2	10,8	10,2	Clorimurom etílico	13,3	11,6	8,7	8
Bifenazate	15,6	12,3	16,9	11,3	Cloroxurom	3	2,8	1,7	1,7
Bifentrina	67,4	9	22,3	7,9	Clorpirifós	11,1	10,7	5,7	5,8
Bitertanol	8,1	7,5	4,8	4,8	Clotianidina	5,7	5,3	4,2	4,1
Boscalida	4,3	3,8	5,4	5,2	Coumafós	6,2	6	3,1	3
Bromuconazol	6,6	5,8	3	2,9	Cresoxim metílico	3,9	3,6	3,8	3,7
Bupirimato	3,7	3,5	2,1	2	Cumilurom	17,2	16,4	14,2	13,2
Buprofezina	2,7	2,5	2,4	2,2	Daimurom	4,4	3,9	2,4	2,2
Butacloro	7,5	7,2	3,1	3	Dazomete	4,1	4	6,8	5,5
Butocarboxim	8,3	7,4	7,8	7,8	Demeton-S-metílico	5,6	5,2	4,4	4,2
Butocarboxim sulfóxido	2,9	2,7	1,7	1,7	Desmedifam	3,9	3,7	2,5	2,4
Cadusafós	8,5	7,4	5,4	4,9	Deltametrina	19,4	19,9	5,6	5,7

APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2		COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)		DP	CV (%)	DP	CV (%)
Diazinona	3,3	3,1	2,3	2,3	Etiofencarbe sulfóxido	3,8	3,6	3,2	3,1
Diclofluanida	11,1	10	4,8	4,6	Etiona	3,9	3,6	3,4	3,3
Diclorvós	7,8	7,4	4,4	4,3	Etiprole	8,4	8,2	3,1	2,9
Dicrotofós	2,9	2,7	4,9	4,9	Etirimol	3,8	3,6	1,9	1,9
Dietofencarbe	3,3	3	2,4	2,3	Etobenzanida	6,8	6,3	6,6	6,4
Difenoconazol	5,9	5,7	3,9	3,9	Etopenprox	5,9	5,3	5,2	5
Difenoxuron	6,2	5,7	3,3	3,3	Etofumesato	4,1	3,9	2,4	2,4
Diflubenzuron	8,1	7,4	8,5	8	Etoprop (Etoprofós)	3,1	3	1,9	1,8
Dimetenamida	4	3,8	2,2	2,2	Etoxazol	2,7	2,5	2,4	2,3
Dimetoato	3	2,8	2,2	2,1	Etrinofós	14,4	14,7	5,8	5,8
Dimetomorfe	4,3	4,4	2,5	2,5	Famoxadona	7,6	7,4	6	5,8
Dimoxistrobina	2,9	2,8	2,2	2,1	Fenamidona	4,2	3,9	3,6	3,6
Diniconazol	8,8	8,3	4,2	4	Fenamifós	3	2,9	2,3	2,2
Dioxacarbe	3,6	3,5	3,3	3,3	Fenarimol	10,3	10,4	5,4	5,4
Dissulfotom	10,4	9,8	4,6	4,5	Fenazaquina	4,9	4,9	3,5	3,5
Diurum	4,8	4,6	2,9	2,9	Fenbuconazol	7,8	7,2	4,9	4,7
DMSA	7,6	7,3	5,7	5,3	Fenhexamida	8,6	8,7	4,6	4,5
DMST	4,6	4,3	1,5	1,5	Fenmedifam	4,6	4,6	2,7	2,8
Dodemorfe	2	1,9	1,6	1,6	Fenobucarbe	2,2	2,1	3,1	3
Dodine	4,6	4,2	3,6	3,5	Fenoxicarbe	4,3	4,1	2,2	2,2
Epoxiconazol	2,7	2,6	2,6	2,5	Fenpiroximato	4,1	3,7	2,4	2,4
Eprinomectina	11,4	12,3	6,5	6,5	Fenpropatrina	8,4	7,9	5,5	5,3
EPTC	10,1	9,4	6,3	6	Fenpropidina	2,2	2,2	3	2,9
Espinetoram	4,2	3,8	4,1	3,8	Fenpropimorfe	2,6	2,5	2,6	2,6
Espinosade A	6,6	6,2	5,3	5,1	Fentiona sulfóxido	4,7	4,5	1,8	1,8
Espinosade D	2,8	2,7	5,2	5,2	Fentoato	5,7	5,4	1,5	1,5
Espirodiclofeno	5,2	4,8	2,4	2,4	Fenurom	4,3	4,2	1,8	1,8
Espiromesifeno	5,2	4,7	3,8	3,6	Flonicamida	8,6	8,5	9,7	10,1
Espirotetramato	3,9	3,7	4,2	4,2	Fluazifope-p-butílico	3,5	3,4	4,6	4,4
Espiroxamina	1,4	1,3	1	1	Flufenacete	4,3	4	2,9	2,8
Esprocarbe	3	2,9	2,1	2,1	Flufenoxurom	7,8	7,1	3	2,9
Etidimurom	5,7	5,3	3,6	3,5	Fluoxastrobina	2,6	2,4	2,5	2,5
Etiofencarbe	5,1	4,9	3	3,1	Fluquinconazol	12,3	12,1	12,2	12,9
Etiofencarbe sulfona	4,1	4,1	2,6	2,7	Flusilazol	3,7	3,3	1	0,9

APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2		COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)		DP	CV (%)	DP	CV (%)
Flutiaceto metílico	18,7	17,6	7,2	7,5	Lactofem	4,6	4,4	3,9	3,8
Flutolanil	4	3,7	3,6	3,5	Linurom	3,1	3	6,1	5,9
Flutriafol	4,7	4,5	3,1	3,1	Malationa	3,4	3,2	0,6	0,6
Fluxaproxade	7,2	6,8	2,8	2,7	Mandipropamida	5	4,6	2,5	2,4
Forclorfenurom	3,5	3,3	1,7	1,6	Mefenacete	2	1,9	1,7	1,6
Fosalona	4,3	4	3	2,9	Mefosfolam	5,3	4,9	3,1	3,1
Fosfamidona	4,4	4,2	1,3	1,3	Mepanipirim	5,1	4,9	4,7	4,7
Fosmete	2,4	2,3	3,3	3,2	Mepronil	3,3	3,2	1,7	1,7
Foxim	4,8	4,3	4,4	4	Mesotriona	4,9	4,9	5,4	5,4
Fuberidazol	3	2,9	3,4	3,3	Metalaxil	4,6	4,3	3,1	3
Furalaxil	4,4	4,3	2,6	2,6	Metalaxil M	2,9	2,7	2,2	2,1
Furatiocarbe	3,4	3,1	1,8	1,7	Metamidofós	4,2	4	2,3	2,4
Halofenosídeo	4,2	3,9	4,4	4,1	Metconazol	4,5	4,5	2,9	3
Heptenofós	7,2	6,6	3,8	3,6	Metidationa	4,1	3,9	3,2	3,1
Hexaconazol	7,8	7,4	4,3	4,2	Metiocarbe	2,1	1,9	1,5	1,5
Hexitiazox	13,9	12,9	10,3	10,5	Metiocarbe sulfona	3,4	3,2	2,2	2,2
Imazalil	6,5	6,4	2,5	2,4	Metiocarbe sulfóxido	2,5	2,3	2	1,9
Imazapique	2,8	2,6	3,1	3	Metobromurom	6,4	6,2	3,2	3,1
Imazapir	7	6,9	3,5	3,5	Metoprene	7,9	11,3	16,4	14,2
Imazaquim	8,5	8,1	4,7	4,6	Metoxifenosida	2,6	2,4	2,5	2,4
Imazetapir	5,3	5,2	1,9	1,9	Metoxurom	4,2	3,9	2,1	2
Imazosulfurom	8,5	8,3	4,3	4,3	Metrafenona	4,2	4,2	3,9	3,9
Imibenconazol	5,9	5,2	4,8	4,2	Metroprotrina	3,5	3,2	3,1	3
Imidacloprido	6,3	5,9	2,7	2,7	Metsulfurom metílico	5,1	4,6	4,3	4,1
Indoxacarbe	12,1	12	3,5	3,4	Mevinfós	5,9	5,8	4,3	4,2
Iprovalicarbe	3,6	3,3	1,8	1,7	Miclobutanil	4	3,8	2,6	2,6
Isocarbamida	2,8	2,6	2,4	2,5	Molinato	6,5	6	5,6	5,3
Isofenofós	7,3	7,1	6,6	6,3	Monalida	5,8	5,6	4,6	4,7
Isoprocarbe	3,1	3,2	1,7	1,8	Monocrotofós	4,3	4	1,6	1,5
Isoprotirolona	4	3,7	3,1	3	Monolinurom	3,3	3,2	3,1	3
Isoproturom	3,2	3,1	3	3	Moxidectina	18,5	18,4	11,3	10,4
Isoxaflutol	10,4	8,9	10,6	9,9	Neburom	2,2	2,1	3	3
Isoxationa	3,1	2,9	3	2,9	Nitenpiram	10,4	9,8	5,6	5,2
Ivermectina	14,7	11,4	3	5,3	Norflurazom	3,8	3,6	2	2

APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2		COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)		DP	CV (%)	DP	CV (%)
Nuarimol	9,7	8,8	5,2	4,9	Propoxur	3,1	2,9	1,9	1,8
Ometoato	3	2,9	1,8	1,8	Proquinazide	11,3	8,7	8	6,3
Oxadiargil	10,2	9,6	6,9	7,1	Protioconazol	20,7	18,4	17,2	17,4
Oxadixil	5	4,8	2,1	2	Quinalfós	2,3	2,2	3,2	3,2
Oxamil	3,2	3,1	2	2,1	Quinoxifem	5,6	5,5	1,8	1,8
Oxamil oxima	8,7	9,3	3,9	4	Quizalofope etílico	12,1	11,1	7	6,6
Oxicarboxina	2	1,9	1	1	Rotenona	9,4	9,1	2,2	2,3
Paclobutrazol	3,6	3,4	2,7	2,6	Sebutilazina	3,1	3	1	1
Pencicuirom	3,4	3,3	1,9	1,8	Sidurom	2,6	2,4	1,5	1,5
Penconazol	4,4	4,3	4,1	4,2	Simazina	9,2	10,1	5,2	5,6
Pendimetalina	6,6	6,2	8,1	8,1	Simetrina	2,6	2,5	2,8	2,8
Permetrina	15,6	14,4	9,6	8,9	Sulfentrazona	2,7	2,9	8	9,2
Picoxistrobina	1,8	1,7	1,7	1,6	Tebuconazol	2,3	2,2	2	2
Pimetrozina	4,7	4,4	0,9	0,9	Tebufenosida	3	2,9	2,1	2,1
Piperonil butóxido	3,1	3	3,2	3,1	Tebufenpirade	5	4,8	1,7	1,7
Piraclostrobina	5,5	5,2	2	1,9	Tebupirinfos	3,1	2,8	3,2	3,1
Pirazofós	2,8	2,7	1,8	1,7	Tebutiurum	1,8	1,7	1,1	1,1
Piridabem	4,9	4,6	5,3	5,1	Temefós	3,8	3,6	2,1	2,1
Piridafentiona	3,7	3,5	2,6	2,5	Tepraloxidim 1	9,9	8,8	8,5	8,5
Pirifenox	4,1	4,1	2,8	2,6	Tepraloxidim 2	10,8	10,4	6	6
Pirimetanil	3,4	3,3	1,1	1,1	Terbufós	12	9,9	9	8,6
Pirimicarbe	2,7	2,5	1,3	1,3	Terbumetom	2,4	2,2	2,6	2,6
Pirimicarbe desmetil	2,9	2,9	2,2	2,3	Terbutrina	3,1	3	1,6	1,6
Pirimifós etílico	2,6	2,6	2,8	2,8	Tetraconazol	5,8	5,5	3,8	3,7
Pirimifós metílico	3,5	3,4	2,3	2,3	Tiabendazol	2,5	2,4	1,5	1,5
Piriproxifem	4,2	3,9	3,2	3,1	Tiacloprido	3,1	2,9	3,6	3,6
Procloraz	5,3	5	3,4	3,2	Tiametoxam	4,8	4,5	2,9	2,8
Profenofós	6,2	5,8	3,8	3,7	Tiobencarbe	12,4	11,1	7,6	7
Prometom	2,5	2,5	1,9	1,9	Tiodicarbe	3,3	3,2	3	3
Prometrina	1,7	1,6	1,7	1,7	Tiofanato metílico	4,4	4,6	1,7	1,9
Propargito	3,4	3,2	4,3	4	Tiofanox	13,9	13,6	9,8	9,9
Propazina	3,5	3,3	1,8	1,8	Tiofanox sulfona	4,4	4,4	3,6	3,8
Propiconazol	3	2,7	3,6	3,6	Tiofanox sulfóxido	6,5	5,8	2,5	2,5
Propizamida (Pronamida)	9,6	9,9	9,7	10,3	Tolifluanida	6,3	5,8	1,9	1,9

APÊNDICE B - Valores encontrados para precisão – Final

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2		COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	DP	CV (%)	DP	CV (%)		DP	CV (%)	DP	CV (%)
Triadimefom	3,5	3,3	3	3	Triflumizol	2,8	2,6	3,6	3,4
Triadimenol	5	4,7	2,6	2,6	Triflumurom	21,9	20	10,5	11,4
Triazofós	3	2,8	1,5	1,4	Triflusulfurom metílico	3,8	3,6	3,4	3,4
Triciclazol	2,3	2,2	3	3	Triticonazol	4,6	4,2	3,2	3,2
Triclorfom	4,3	4,2	3,4	3,3	Uniconazol	3,3	3,2	3,4	3,3
Tridemorfe	4,3	4,1	1,8	1,8	Vamidotiona	4,4	4,1	3,6	3,4
Trifenmorfe	2,9	2,7	3	2,9	Zoxamida	4,8	4,5	3,3	3
Trifloxistrobina	3,4	3,2	3,4	3,4					

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continua

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
3-OH-Carbofurano	0,049	104,7	0,119	101,4
Acefato	0,049	103,4	0,118	100,5
Acetamiprido	0,05	105,6	0,119	101,3
Acetocloro	0,049	103,7	0,12	102
Alacloro 1	0,051	109,3	0,127	108,2
Alanicarbe	0,05	106,2	0,111	94,6
Aldicarbe	0,05	105,9	0,113	96,3
Aldicarbe sulfona	0,05	106	0,121	102,6
Aldicarbe sulfóxido	0,055	117,3	0,123	104,5
Ametrina	0,049	104,6	0,119	101,2
Amicarbazona	0,05	106	0,113	96,4
Aminocarbe	0,05	106	0,121	103,3
Atrazina	0,048	101,2	0,118	100,7
Azaconazol	0,049	103,9	0,12	102,4
Azadiractina	0,045	94,9	0,14	118,9
Azametifós	0,05	105,9	0,12	102,1
Azinfós etílico	0,051	107,8	0,118	100,6
Azinfós metílico	0,048	101,6	0,127	107,9
Azoxistrobina	0,052	110,4	0,123	104,7
Benalaxil	0,051	107,6	0,121	103
Bendiocarbe	0,049	104,2	0,122	103,3
Benfuracarbe	0,053	112,8	0,116	98,2
Benomil	0,052	109,5	0,124	105,1
Benzoato de emamectina	0,053	112	0,125	106,4
Bitertanol	0,051	108,1	0,12	101,8
Boscalida	0,053	113,6	0,123	104,2
Bromofós metílico	0,034	71,4	0,136	115,4
Bromuconazol	0,054	114,2	0,12	102,1
Bupirimato	0,05	105,7	0,124	105,3
Buprofezina	0,05	105,7	0,125	106,3
Butacloro	0,049	103,5	0,121	102,7
Butocarboxim	0,053	112,1	0,118	100,4
Butocarboxim sulfóxido	0,05	107,1	0,119	101,3
Cadusafós	0,054	115	0,127	108,3
Carbaril	0,051	109,1	0,124	105,5
Carbendazim	0,05	106,8	0,121	103,1
Carbetamida	0,049	104,5	0,116	98,8
Carbofurano	0,05	107	0,122	103,8
Carboxina	0,048	101,5	0,114	97
Carbutilato	0,055	117,4	0,139	117,8
Carfentrazona etílica	0,047	100,9	0,111	94,1
Carpropamida	0,049	105	0,123	104,9

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
Ciazofamida	0,049	103,5	0,118	100,2
Cicloxidine	0,045	96,3	0,107	91,1
Ciflufenamida	0,051	109,2	0,124	105,7
Cimoxanil	0,047	100,9	0,118	100,3
Cipermetrina	0,04	84,1	0,137	116,6
Ciproconazol	0,047	100,2	0,128	108,5
Ciprodinil	0,048	102,2	0,119	101,6
Ciromazina	0,052	109,5	0,12	102,3
Clodimeforme	0,049	105	0,125	106,2
Clofentezina	0,048	102,7	0,131	111,6
Clomazona	0,049	105	0,12	102,1
Clorantranilprole	0,049	104	0,117	99,7
Clorbromurom	0,051	108,9	0,114	96,7
Clorfenvinfós	0,051	107,4	0,122	103,8
Clorfluazurom	0,05	105,4	0,115	97,5
Clorimurom etílico	0,054	114,9	0,127	108
Cloroxurom	0,051	107,5	0,12	101,8
Clorpirifós	0,049	103,4	0,115	97,7
Clorpirifós metílico	0,046	97,8	0,094	80,3
Clotianidina	0,05	106,5	0,118	100,7
Coumafós	0,049	104	0,12	102,3
Cresoxim metílico	0,051	108	0,121	102,6
Cumilurom	0,049	105,1	0,126	107,5
Daimurom	0,052	110,6	0,128	108,4
Demeton-S-metílico	0,051	107,8	0,123	104,5
Desmedifam	0,05	107	0,121	103,2
Deltametrina	0,046	97,6	0,116	98,8
Diazinona	0,05	106,9	0,12	102,1
Diclofluánida	0,052	111,1	0,123	104,7
Diclorvós	0,05	106	0,122	103,4
Dicrotofós	0,052	109,6	0,118	100,4
Dietofencarbe	0,051	108,1	0,124	105,4
Difenoconazol	0,049	104,2	0,12	101,9
Difenoخورon	0,051	109	0,118	100,1
Diflubenzuron	0,051	109,3	0,125	106,5
Dimetenamida	0,05	105,7	0,121	102,7
Dimetoato	0,05	106,1	0,12	101,7
Dimetomorfe	0,047	99	0,115	98
Dimoxistrobina	0,05	105,7	0,12	101,7
Diniconazol	0,05	105,2	0,124	105,5
Dioxacarbe	0,05	105,2	0,118	100,2
Dissulfotom	0,05	106,5	0,118	100,5
Diurom	0,049	104,8	0,118	100
DMSA	0,049	103,5	0,128	108,8

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Média (%)
DMST	0,05	106,6	0,121	102,7
Dodemorfe	0,049	105	0,121	102,7
Dodine	0,051	108,6	0,122	103,3
Doramectina	0,048	102,2	0,12	101,9
Epoxiconazol	0,049	104,9	0,121	103
Eprinomectina	0,044	93,4	0,118	100,2
EPTC	0,05	106,8	0,123	104,8
Espinetoram	0,052	110,7	0,127	108,1
Espinosade A	0,05	106,4	0,124	105,2
Espinosade D	0,05	106,1	0,118	100
Espirodiclofeno	0,051	108,5	0,119	101,3
Espiromesifeno	0,051	109,3	0,122	103,9
Espirotetramato	0,05	105,9	0,118	100,6
Espiroxamina	0,05	106	0,123	104,4
Esprocarbe	0,049	103,8	0,119	101,4
Etidimurum	0,05	106,1	0,118	100,4
Etiofencarbe	0,049	103,4	0,114	97,3
Etiofencarbe sulfona	0,048	101,6	0,113	96,1
Etiofencarbe sulfóxido	0,051	107,4	0,121	102,9
Etiona	0,051	107,4	0,123	104,9
Etiprole	0,048	102,8	0,126	107,4
Etirimol	0,049	104,9	0,121	102,4
Etobenzanida	0,051	108	0,122	103,9
Etofenprox	0,053	112,5	0,122	103,9
Etofumesato	0,05	105,3	0,117	99,9
Etoprop (Etoprofós)	0,049	103,9	0,12	101,8
Etoxazol	0,051	107,5	0,121	103,3
Etrinfós	0,046	98,5	0,118	100,2
Famoxadona	0,049	103,3	0,121	102,5
Fenamidona	0,05	107,3	0,117	99,8
Fenamifós	0,05	105,4	0,12	101,9
Fenarimol	0,047	99,7	0,118	100,1
Fenazaquina	0,047	99,9	0,117	99,8
Fenbuconazol	0,051	107,8	0,121	103,2
Fenhexamida	0,047	99,9	0,119	101
Fenitrotiona	0,041	86,6	0,108	91,8
Fenmedifam	0,048	101,6	0,111	94,7
Fenobucarbe	0,049	105,1	0,123	104,1
Fenoxicarbe	0,049	104,7	0,119	101,4
Fenpiroximato	0,052	109,4	0,118	100,1
Fenpropatrina	0,05	105,9	0,122	104,1
Fenpropidina	0,049	104,3	0,119	101
Fenpropimorfe	0,049	104,7	0,12	102,1
Fentiona	0,04	85	0,109	92,6

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
Fentiona sulfóxido	0,05	106,3	0,117	99,2
Fentoato	0,05	106,4	0,122	103,8
Fenurom	0,048	103,1	0,119	100,9
Flonicamida	0,047	100,7	0,113	96,3
Fluazifope-p-butílico	0,049	104,9	0,124	105,1
Flufenacete	0,051	107,6	0,122	103,5
Flufenoxurom	0,052	110,1	0,125	106,1
Fluoxastrobina	0,05	106,1	0,12	101,9
Fluquinconazol	0,048	101,9	0,111	94,8
Flusilazol	0,052	110,1	0,12	102
Flutiaceto metílico	0,05	106,4	0,114	97,1
Flutolanil	0,05	106,9	0,12	101,9
Flutriafol	0,049	104,9	0,119	101,3
Fluxaproxade	0,05	106,7	0,12	102,4
Forclorfenurom	0,05	107,1	0,119	100,8
Fosalona	0,051	108	0,12	102,3
Fosfamidona	0,048	102,8	0,119	101,2
Fosmete	0,049	103,4	0,12	102,2
Foxim	0,053	112	0,128	108,8
Fuberidazol	0,048	101	0,121	102,5
Furalaxil	0,048	101,6	0,117	99,9
Furatiocarbe	0,051	107,8	0,121	102,7
Halofenosídeo	0,051	107,4	0,127	107,6
Heptenofós	0,051	108,6	0,124	105,2
Hexaconazol	0,05	105,6	0,12	101,6
Hexitiazox	0,051	107,7	0,116	98,3
Imazalil	0,047	100,6	0,122	103,6
Imazapique	0,051	108,4	0,122	103,3
Imazapir	0,048	102,2	0,12	102,2
Imazaquim	0,049	104,9	0,122	103,3
Imazetapir	0,048	102,1	0,116	98,7
Imazosulfurom	0,048	102,6	0,118	100,4
Imibenconazol	0,054	114,4	0,135	114,3
Imidacloprido	0,051	107,5	0,118	100,5
Indoxacarbe	0,047	100,4	0,119	100,8
Iprovalicarbe	0,052	109,5	0,121	102,6
Isocarbamida	0,049	104,4	0,116	98,9
Isocarbofós	0,04	84,8	0,11	93,7
Isofenofós	0,049	103,7	0,124	105
Isoprocarbe	0,046	98,8	0,112	95,3
Isoprotiolona	0,051	107,8	0,123	104,6
Isoproturom	0,049	104,1	0,119	100,9
Isoxaflutol	0,055	116,3	0,126	107
Isoxationa	0,05	106,1	0,123	104,2

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
Lactofem	0,05	106,1	0,118	100,7
Lambda-cialotrina	0,054	114,1	0,128	108,5
Linurom	0,049	104,8	0,12	102,1
Malationa	0,051	108,1	0,121	102,8
Mandipropamida	0,051	109,1	0,122	104
Mefenacete	0,05	106,4	0,123	104,4
Mefosfolam	0,05	106,4	0,118	100,6
Mepanipirim	0,049	104,9	0,117	99
Mepronil	0,049	104,2	0,121	102,5
Mesotriona	0,047	99,4	0,118	100
Metalaxil	0,05	106,4	0,123	104,4
Metalaxil M	0,051	108,2	0,123	104,2
Metamidofós	0,05	105,5	0,116	98,2
Metconazol	0,048	101,6	0,116	98,3
Metidationa	0,05	106,2	0,121	102,5
Metiocarbe	0,05	106,3	0,12	102,4
Metiocarbe sulfona	0,05	105,3	0,12	102,4
Metiocarbe sulfóxido	0,052	109,5	0,123	104,7
Metobromurom	0,048	102,9	0,122	103,7
Metomil	0,052	109,6	0,122	93,5
Metoxifenosida	0,051	107,5	0,124	105,7
Metoxurom	0,05	106,9	0,122	103,9
Metrafenona	0,047	99,5	0,118	100,3
Metroprotrina	0,051	108,3	0,121	102,9
Metsulfurom metílico	0,052	109,4	0,123	104,6
Mevinfós	0,048	102,3	0,119	101,5
Miclobutanil	0,049	103,3	0,12	101,6
Molinato	0,051	108,8	0,124	105,7
Monalida	0,049	103,2	0,116	98,5
Monocrotofós	0,05	106	0,121	102,8
Monolinurom	0,049	104,4	0,12	102
Moxidectina	0,047	100,4	0,128	108,6
Neburom	0,049	104,9	0,117	99,1
Nitenpiram	0,05	105,9	0,126	107,5
Norflurazom	0,049	104,1	0,119	101,5
Novalurom	0,047	100,1	0,108	91,6
Nuarimol	0,052	110,2	0,124	105,5
Ometoato	0,049	104	0,118	100,1
Oxadiargil	0,05	106,1	0,115	97,7
Oxadixil	0,05	105,5	0,122	103,6
Oxamil	0,048	102,5	0,111	94,6
Oxamil oxima	0,044	93,7	0,116	98,5
Oxicarboxina	0,05	106,8	0,121	103,2
Paclobutrazol	0,05	105,6	0,122	103,4

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Continuação

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
Pencicuroom	0,049	104,5	0,12	101,8
Penconazol	0,048	102,4	0,117	99,1
Pendimetalina	0,05	105,7	0,118	100,6
Permetrina	0,051	108,3	0,126	107,5
Picoxistrobina	0,051	108	0,121	102,9
Pimetrozina	0,051	107,5	0,119	101
Piperonil butóxido	0,05	105,5	0,121	103,1
Piraclostrobina	0,05	106	0,122	103,7
Pirazofós	0,049	103,8	0,121	103,1
Piridabem	0,049	105	0,123	104,3
Piridafentiona	0,05	105,6	0,122	104,1
Pirifenox	0,048	102,2	0,124	105,3
Pirimetaniil	0,049	104,7	0,114	96,9
Pirimicarbe	0,05	106,8	0,121	102,9
Pirimicarbe desmetil	0,048	101,7	0,114	96,6
Pirimifós etílico	0,048	101,9	0,119	100,8
Pirimifós metílico	0,049	104,4	0,121	102,6
Piriproxifem	0,05	106,8	0,122	103,5
Procloraz	0,05	106,6	0,122	104,1
Profenofós	0,05	106,4	0,121	102,6
Prometom	0,048	102,6	0,117	99,6
Prometrina	0,049	104,6	0,118	100,3
Propanil	0,059	100,8	0,136	115,8
Propargito	0,051	108	0,125	105,8
Propazina	0,05	106,2	0,122	103,3
Propiconazol	0,051	108,4	0,119	101,1
Propizamida (Pronamida)	0,046	96,8	0,111	94,1
Propoxur	0,051	107,9	0,125	106,5
Protioconazol	0,053	112,7	0,116	98,8
Quinalfós	0,049	103,8	0,118	100,5
Quinoxifem	0,048	102,4	0,115	98
Quizalofope etílico	0,051	109,4	0,125	106,7
Rotenona	0,048	102,9	0,112	95,3
Sebutilazina	0,049	104,3	0,119	101,3
Sidurom	0,05	105,7	0,117	99,7
Simazina	0,043	90,5	0,11	93,6
Simetrina	0,049	104,7	0,119	100,9
Sulfentrazona	0,044	94,3	0,103	87,4
Tebuconazol	0,049	104,3	0,116	98,9
Tebufenosida	0,05	105,3	0,117	99,3
Tebufenpirade	0,049	103,6	0,119	100,9
Tebupirinfos	0,051	108,4	0,122	103,8
Tebutiurum	0,049	104	0,119	101,1
Temefós	0,049	104,5	0,116	98,8

APÊNDICE C - Valores encontrados para exatidão – Final

COMPOSTOS	Nível 1		Nível 2	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Média (%)
Tepraloxidim 1	0,053	111,7	0,117	99,8
Tepraloxidim 2	0,049	103,1	0,119	100,8
Terbumetom	0,05	106,3	0,117	99,5
Terbutrina	0,048	102,9	0,118	100,2
Tetraconazol	0,049	104,6	0,118	100,7
Tiabendazol	0,048	101,8	0,117	99,5
Tiacloprido	0,05	106,7	0,119	101,1
Tiametoxam	0,05	106,5	0,122	103,8
Tiobencarbe	0,053	111,7	0,126	107,3
Tiodicarbe	0,049	104,8	0,118	100,4
Tiofanato metílico	0,045	94,9	0,111	94,5
Tiofanox	0,048	102,5	0,116	98,2
Tiofanox sulfona	0,047	99,9	0,109	93
Tiofanox sulfóxido	0,053	112,7	0,119	101,5
Tolclofós metílico	0,052	109,8	0,136	115,5
Tolifluanida	0,051	109,1	0,116	98,8
Triadimefom	0,049	105,1	0,121	102,6
Triadimenol	0,05	106,1	0,118	100,4
Triazofós	0,05	106,3	0,122	103,6
Triciclazol	0,049	104,4	0,119	100,8
Triclorfom	0,048	102	0,119	100,9
Tridemorfe	0,049	103,7	0,118	100,1
Trifenmorfe	0,05	106,7	0,121	103,2
Trifloxistrobina	0,05	105,4	0,119	101,5
Triflumizol	0,05	106,7	0,124	105,4
Triflumurom	0,052	109,5	0,109	92,3
Triflusulfurom metílico	0,049	105	0,119	100,9
Triforina	0,041	86,3	0,108	91,6
Triticonazol	0,052	111,5	0,119	101,4
Uniconazol	0,049	104,2	0,121	102,6
Vamidotiona	0,051	107,5	0,123	104,5
Zoxamida	0,05	105,7	0,126	106,7

APÊNDICE D – IAs validados para a matriz tintura de *M. glomerata* 10% em CLUE-EM/EM – Continua

IAs validados para CLUE-EM/EM		
3-OH-Carbofurano	Carfentrazona etílica	Dioxacarbe
<u>Acefato</u>	Carpropamida	Dissulfotom
Acetamiprido	Ciazofamida	Diurom
<u>Alacloro 1</u>	Cicloxiclina	DMSA
Alanicarbe	Ciflufenamida	DMST
Aldicarbe	Cimoxanil	Dodemorfe
Aldicarbe sulfona	Ciproconazol	Dodine
Ametrina	Ciprodinil	Epoxiconazol
Amicarbazona	Ciromazina	Espinetoram
Aminocarbe	Clodimeforme	Espinosade A
Atrazina	Clomazona	Espinosade D
Azaconazol	Clorantraniliprole	Espirodiclofeno
Azametifós	Clorbromurom	Espiromesifeno
<u>Azinfós etílico</u>	<u>Clorfenvinfós</u>	Espirotetramato
<u>Azinfós metílico</u>	Clorfluazurom	Espiroxamina
Azoxistrobina	Cloroxurom	Esprocarbe
Benalaxil	Clotianidina	Etidimurom
Bendiocarbe	Coumafós	Etiofencarbe
Benomil	Cresoxim metílico	Etiofencarbe sulfona
Benzoato de emamectina	Daimurom	Etiofencarbe sulfóxido
Bitertanol	Demeton-S-metílico	<u>Etiona</u>
Boscalida	Desmedifam	Etiprole
Bromuconazol	<u>Diazinona</u>	Etirimol
Bupirimato	<u>Diclofluanaida</u>	Etobenzanida
Buprofezina	<u>Diclorvós</u>	Etofenprox
Butacloro	Dicrotofós	Etofumesato
Butocarboxim	Dietiofencarbe	Etoprop (Etoprofós)
Butocarboxim sulfóxido	Difenoconazol	Etoxazol
Cadusafós	Difenoxuron	<u>Etrinfós</u>
Carbaril	Diflubenzuron	Famoxadona
Carbendazim	Dimetenamida	Fenamidona
Carbetamida	<u>Dimetoato</u>	Fenamifós
Carbofurano	Dimetomorfe	Fenarimol
Carboxina	Dimoxistrobina	Fenazaquina
Carbutilato	Diniconazol	Fenbuconazol

Legenda: As substâncias grifadas representam os IAs encontrados no anexo V da RDC 105 de 2016.

APÊNDICE D – IAs validados para a matriz tintura de *M. glomerata* 10% em CLUE-EM/EM – Continuação

IAs validados para CLUE-EM/EM		
Fenhexamida	Imazapir	Metrafenona
Fenmedifam	Imazaquim	Metroprotrina
Fenobucarbe	Imazetapir	Metsulfurom metílico
Fenoxicarbe	Imazosulfurom	Mevinfós
Fenpiroximato	Imibenconazol	Miclobutanil
<u>Fenpropatrina</u>	Imidacloprido	Molinato
Fenpropidina	Indoxacarbe	Monalida
Fenpropimorfe	lprovalicarbe	<u>Monocrotofós</u>
<u>Fentiona sulfóxido</u>	Isocarbamida	Monolinurom
Fentoato	Isofenofós	Neburom
Fenurom	Isoprocarbe	Nitenpiram
Flonicamida	Isoprotiolona	Norflurazom
Fluazifope-p-butílico	Isoproturom	Nuarimol
Flufenacete	Isoxaflutol	Ometoato
Flufenoxurom	Isoxationa	Oxadiargil
Fluoxastrobina	Lactofem	Oxadixil
Fluquinconazol	Linurom	Oxamil
Flusilazol	<u>Malationa</u>	Oxamil oxima
Flutolanil	Mandipropamida	Oxicarboxina
Flutriafol	Mefenacete	Paclobutrazol
Fluxaproxade	Mefosfolam	Pencicurom
Forclorfenurom	Mepanipirim	Penconazol
<u>Fosalona</u>	Mepronil	<u>Pendimetalina</u>
Fosfamidona	Mesotriona	<u>Permetrina</u>
<u>Fosmete</u>	Metalaxil	Picoxistrobina
Foxim	Metalaxil M	Pimetrozina
Fuberidazol	<u>Metamidofós</u>	<u>Piperonil butóxido</u>
Furalaxil	Metconazol	Piraclostrobina
Furatiocarbe	<u>Metidationa</u>	Pirazofós
Halofenosídeo	Metiocarbe	Piridabem
Heptenofós	Metiocarbe sulfona	Piridafentiona
Hexaconazol	Metiocarbe sulfóxido	Pirifenox
Hexitiazox	Metobromurom	Primetanil
Imazalil	Metoxifenosida	Pirimicarbe
Imazapique	Metoxurom	Pirimicarbe desmetil

Legenda: As substâncias grifadas representam os IAs encontrados no anexo V da RDC 105 de 2016.

APÊNDICE D – IAs validados para a matriz tintura de *M. glomerata* 10% em CLUE-EM/EM – Final

IAs validados para CLUE-EM/EM		
<u>Pirimifós etílico</u>	Tiobencarbe	Tiofanox sulfona
<u>Pirimifós metílico</u>	Tiodicarbe	Tiofanox sulfóxido
Piriproxifem	Simazina	Tolifluanida
Procloraz	Simetrina	Triadimefom
<u>Profenofós</u>	Sulfentrazona	Triadimenol
Prometom	Tebuconazol	Triazofós
Prometrina	Tebufenosida	Triciclazol
Propargito	Tebufenpirade	Triclorfom
Propazina	Tebupirinfos	Tridemorfe
Propiconazol	Tebutiurum	Trifenmorfe
Propizamida (Pronamida)	Temefós	Trifloxistrobina
Propoxur	Tepraloxidim 1	Triflumizol
Protioconazol	Tepraloxidim 2	Triflumurum
<u>Quinalfós</u>	Terbumetom	Triflusulfurum metílico
Quinoxifem	Terbutrina	Triticonazol
Quizalofope etílico	Tetraconazol	Uniconazol
Rotenona	Tiabendazol	Vamidotiona
Sebutilazina	Tiacloprido	Zoxamida
Sidurom	Tiofanato metílico	
Tiametoxam	Tiofanox	

Legenda: As substâncias grifadas representam os IAs encontrados no anexo V da RDC 105 de 2016.