



## Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas

Kariane M. NUNES <sup>1</sup>, Wagner L.R. BARBOSA <sup>2</sup>, Eliana F. OZELA <sup>3</sup> & José O.C. SILVA JÚNIOR\* <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório P&D de Farmacotécnica, <sup>2</sup> Laboratório de Fitoquímica,

<sup>3</sup> Laboratório de Bromatologia, Faculdade de Farmácia,

Universidade Federal do Pará, Campus Guamá, 66075-110, Belém, PA, Brasil.

**RESUMO.** Apesar da extensa utilização dos fitoterápicos, a qualidade destes medicamentos muitas vezes é deficiente e questionável. A tintura de *Calendula officinalis* L. tem um vasto emprego na obtenção de formulações fitoterápicas semi-sólidas, por seus efeitos antiinflamatórios, antisépticos e cicatrizantes. Sendo assim, o presente estudo objetivou a aplicação de metodologias estabelecidas pela legislação brasileira para a caracterização e controle de qualidade do pó e tintura de *C. officinalis*, visando à padronização da tintura. Por meio de análises físicas e físico-químicas foram obtidos especificações farmacognósticas condizentes com as da literatura, além de constatar a identidade do material vegetal através da detecção do marcador químico rutina e ácido clorogênico por cromatografia em camada delgada (CCD). Através da validação do método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível estabelecer a concentração de rutina na tintura (463 µg/mL) e assegurar a sua qualidade. Estes resultados proporcionaram a padronização da tintura de *C. officinalis*.

**SUMMARY.** "Standardization of *Calendula officinalis* L. Tincture for its Use in Semi-solid Phytotherapeutic Formulations". Despite the extensive use of phytotherapics, the quality of these drugs is often poor and questionable. The tincture of *Calendula officinalis* L. has a wide employment in the production of semi-solid phytotherapeutic formulations for their anti-inflammatory, antiseptic and healing effects. Thus, this study aimed at the implementation of methodologies established by Brazilian legislation for the characterization and quality control of dust and tincture of calendula, aiming at standardization of the tincture. Pharmacognostic specifications, consistent with the literature, were obtained by physical and physico-chemical analyses. In addition, the detection of rutin and chlorogenic acid by Thin-Layer Chromatography (TLC) as chemical markers, were used to establish the identity of the plant material. The validation of the quantification method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) made possible to establish the rutin concentration in tincture (463 µg/mL) and to ensure their quality. These results provided the standardization of *C. officinalis* tincture.

### INTRODUÇÃO

Em 1978, por meio da declaração de Alma-Ata <sup>1</sup>, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais e seus derivados fitoterápicos no âmbito sanitário, tendo em vista que 80% da população mundial utilizam essas plantas ou preparações destas no que se refere à atenção primária a saúde <sup>1</sup>. O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 22 bilhões de dólares <sup>2</sup>, no Brasil, de acordo

com a Abifisa, este setor movimentava anualmente cerca de 2,3 bilhões de dólares em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas <sup>3</sup>. Contudo, em meio à ascensão da utilização dos fitoterápicos como alternativa terapêutica na medicina oficial, a qualidade dos produtos farmacêuticos derivados de plantas medicinais muitas vezes é deficiente e questionável, o que pode estar relacionada a vários fatores, que vão desde diferentes formas de cultivo, colheita, secagem e condições de armazenamento do mate-

**PALAVRAS CHAVE:** *Calendula officinalis* L., Controle de qualidade de fitoterápicos, Padronização de tintura, Rutina.

**KEY WORDS:** *Calendula officinalis* L., Phytotherapeutic quality control, Rutin, Tincture standardization.

\* Autor a quem a correspondência deve ser enviada: E-mail: carrera@ufpa.br

rial vegetal até técnicas de desenvolvimento farmacêutico para a obtenção do produto acabado <sup>4,5</sup>. Segundo Farias *et al.* <sup>6</sup>, colocar no mercado produtos de segurança e eficácia estabelecidas é um princípio ético que deve nortear a produção de medicamentos.

Em 2008 o Ministério da Saúde do Brasil instituiu o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde. Esta medida beneficiará diversos setores da cadeia produtiva desde o cultivo das plantas até a produção do fitoterápico, com intuito de gerar emprego e renda, de desenvolvimento local e estruturação dos setores envolvidos na produção. Além de incentivar à pesquisa, desenvolvimento de tecnologia e inovações nas diversas etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos <sup>7</sup>. O que resultará na ampliação do arsenal terapêutico oferecidos pelo SUS aos usuários, com garantia da sua qualidade, segurança e eficácia, na perspectiva da integralidade da atenção básica à saúde pública.

*Calendula officinalis* L. é uma herbácea anual de origem européia, adaptada ao Brasil e pertencente à família Asteraceae, utilizada extensivamente na fitoterapia por suas atividades antiinflamatórias, cicatrizantes e antibacterianas <sup>8,9</sup>. Dentre as classes de metabólitos secundários mais pesquisados nesta espécie estão os flavonóides, responsáveis por grande parte de suas atividades biológicas, destacando-se o heterosídeo flavonoídico rutina, como um dos marcadores químicos de interesse na padronização dos derivados vegetais oriundos da *Calendula officinalis* L. <sup>8,10,11</sup>.

Alguns trabalhos têm relatado a importância do controle de qualidade desta espécie para a padronização dos seus derivados fitoterápicos. Em estudo realizado por Lalla *et al.* <sup>12</sup>, foi avaliada a qualidade de duas amostras de tintura mãe de *C. officinalis* oriundas da Índia e da Alemanha por meio de obtenção de perfis cromatográficos em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) utilizando-se os biomarcadores rutina e quercetina. Os resultados indicaram ausência total da rutina na tintura mãe procedente da Índia, entretanto, tanto a rutina quanto a quercetina estavam presentes na tintura mãe procedente da Alemanha, demonstrando claramente a diferença na detecção dos marcadores indicados para as tinturas mães de *C. Officinalis* L. produzidas nos dois países. Além disso, Bilia *et al.* <sup>13</sup> avaliaram a estabilidade química dos constituintes flavonoídicos da tintura de *C. officinalis* obtidas em diferentes graduações alcoólicas (40 e

60% v/v) através de testes de estabilidade térmica acelerado e de longo prazo utilizando CLAE. Os resultados demonstraram que a tintura de *C. officinalis* 60% v/v apresentou maior vida útil em prateleiras. Comprovando a importância da escolha da graduação alcoólica na manutenção dos constituintes flavonoídicos da tintura.

Em decorrência do relevante emprego desta espécie na obtenção de formulações fitoterápicas semi-sólidas em escala mundial, o presente estudo teve como objetivo a aplicação de metodologias estabelecidas para a caracterização e controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do derivado da droga vegetal, exigidos pela legislação brasileira, a RDC n° 48 de 2004, que dispõe sobre a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos <sup>14</sup>, e por monografia da espécie em estudo <sup>15</sup>, visando à padronização da tintura hidroalcoólica de *C. Officinalis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As flores secas e pulverizadas da *Calendula officinalis* L. (Lote: CALE 06/02, conforme laudo emitido) utilizadas no estudo, foram adquiridas no mercado brasileiro por uma empresa especializada na comercialização de matérias-primas vegetais em todo país, situada na cidade de Ribeirão Preto no estado de São Paulo.

### Reagentes e soluções de referência

O padrão de rutina foi adquirido da Sigma-Aldrich® (pureza 95%), os solventes de grau HPLC utilizados na preparação da fase móvel e preparação das soluções padrões de rutina foram o acetonitrila e etanol absoluto respectivamente, obtidos da J.T.Baker® (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ). O acetato de etila, ácido fórmico e ácido acético glacial da Vetec® (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

### Caracterização física e físico-química do pó das flores de *Calendula officinalis* L.

#### Propriedades organolépticas

Foram observados a coloração, o odor e o sabor das flores pulverizadas da *C. officinalis* segundo especificações da Farmacopéia Brasileira <sup>15</sup>.

#### Determinação da distribuição granulométrica

Aproximadamente 10 g do pó foram submetidos a uma série de tamizes de diferentes aberturas de malha agitados por 30 min em agitador eletromagnético para peneiras (Modelo Bertel). A análise foi realizada em triplicata <sup>16</sup>.

#### *Determinação de perda por dessecação*

O teor de umidade foi determinado em triplicata por aquecimento em estufa termostabilizada (Quimis) a 105 °C, utilizando-se cerca de 2,0 g do pó em pesa-filtros <sup>16</sup>.

#### *Determinação do teor de cinzas totais*

O teor de cinzas totais foi determinado em triplicata por incineração das cinzas em forno mufla a 450 °C, utilizando-se cerca de 2,0 g de pó em cadinhos <sup>16</sup>.

#### **Preparação da tintura**

Para obtenção da tintura hidroalcoólica das flores de *Calendula officinalis* L., utilizou-se o método de extração por maceração do pó das flores em etanol 70° GL <sup>17</sup>.

#### **Caracterização química e físico-química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L**

##### *Determinação da densidade aparente*

Foi realizada em triplicata utilizando-se o método da picnometria <sup>15</sup>.

##### *Determinação do pH*

Foi realizado em potenciômetro (Meter®) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações independentes <sup>15</sup>.

##### *Determinação do resíduo seco*

Amostras em triplicata (2,0 g da tintura) foram transferidas para cápsulas de porcelana, evaporadas à secura em banho de água e levadas a resíduo seco em estufa a 105 °C <sup>18</sup>.

#### **Prospecção Química**

Na análise fitoquímica da tintura, investigou-se qualitativamente a presença dos seguintes metabólitos secundários em triplicata: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, aminoácidos, antraquinonas, catequinas, depsídeos, depsídonas, derivados da cumarina, esteróides, fenóis, flavonóides, glicosídeos cardíacos, polisacarídeos, proteínas, purinas, saponinas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, taninos e triterpenóides, segundo metodologia proposta por Barbosa <sup>19</sup>.

#### **Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A determinação do perfil cromatográfico da tintura por CCD foi realizada através da técnica de cromatografia e co-cromatografia por adsorção em placa. Alíquotas de 60 µL da tintura e 20

µL da solução etanólica do padrão de rutina (1 mg/mL), utilizada como referência, foram aplicados sobre cromatoplasmas de gel de sílica normal (Merck®), eluídas com acetato de etila/ác.fórmico/ác.acético glacial/água (100:11:11:26), reveladas com reagente NP/PEG e visualizadas sob luz ultravioleta de 365 nm <sup>20</sup>. Logo após, as placas foram fotografadas e o valor do fator de retenção (Rf) de cada zona cromatográfica foi calculado.

#### **Espectrometria na Região do Infravermelho**

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho da tintura previamente liofilizada (liofilizador Edwards - Edwards do Brasil) e padrão de rutina foram realizadas em um espectrofotômetro com transformador de Fourier (FTIR, Nicolet modelo Projete 460) utilizando discos de KBr na região espectral de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.

#### **Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

##### *Condições cromatográficas*

A análise do marcador químico rutina na tintura foi realizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Merck Hitachi LaChrom® D-7000 com detector no ultravioleta (UV) com arranjo de diodos. Empregou-se uma coluna Agilent LiChrospher 100®, RP18 (5 µm e 250 x 3,0 mm) mantida a temperatura de 26 °C. A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetoneitrila e água ultra-pura, a pH 3,0 ajustado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 50%, em gradiente linear, com fluxo de 1,3 mL/min durante 42 min. O volume da amostra carregada foi de 50 µL sendo 20 µL injetados pelo sistema de injeção Rheodyne. A análise foi monitorada a 250, 280, 330 e 350 nm <sup>21</sup>.

##### *Validação*

Na validação do método analítico empregado para a quantificação do marcador químico rutina na tintura de *C. officinailis* foram adotados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, curva de calibração e repetibilidade (precisão intra-corrída), segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA <sup>22</sup>.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

##### **Caracterização física e físico-química do pó das flores de *Calendula officinalis* L.**

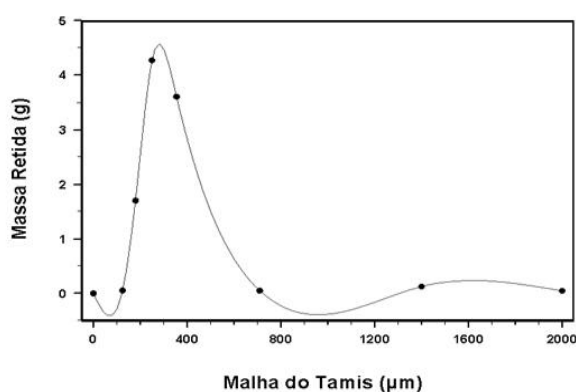
##### *Propriedades organolépticas*

Uma das importantes etapas preliminares de

identificação da matéria-prima é a avaliação dos caracteres organolépticos<sup>23</sup>. Desta forma, o pó das flores de *Calendula officinalis* L. apresentou cor castanho-amarelado, odor fraco e sabor levemente amargo, conforme especificações farmacopeicas<sup>15</sup>.

#### Determinação da distribuição granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica de drogas vegetais avalia a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal, sendo assim, um parâmetro preliminar de suma importância para a escolha do processo de extração adequado<sup>24</sup>. Após a tamização do pó das flores de *Calendula officinalis* L., constatou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis de malha 710  $\mu\text{m}$  e menos de 40% passaram pelo tamis de malha 250  $\mu\text{m}$ , caracterizando-o como pó moderadamente grosso de acordo com especificações farmacopeicas<sup>16</sup>, ilustrado na Fig. 1. Contudo, este resultado foi divergente ao emitido pelo laudo técnico da matéria-prima vegetal em estudo, o que reforça a necessidade da confirmação dos resultados de laudos técnicos emitidos por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos e matérias-primas vegetais, bem como a qualificação desses fornecedores, pois segundo Carvalho *et al.*<sup>5</sup> a qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico.



**Figura 1.** Determinação da distribuição granulométrica do pó de *Calendula officinalis* L.

#### Determinação de perda por dessecação e do teor de cinzas totais

A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal. O valor obtido nessa análise para o pó de *C. officinalis* foi de 11,42%, o qual se encontra dentro

dos limites estabelecidos em sua monografia farmacopeica, que relata valor máximo de 12%<sup>15</sup>. Sob o ponto de vista tecnológico e de produção, este resultado é de grande relevância para assegurar a estabilidade microbiológica e química da formulação fitoterápica, uma vez que, teores de umidade acima do especificado propiciam a proliferação de fungos e bactérias, assim como, possíveis degradações de substâncias químicas por processos de hidrólise mesmo em um curto prazo. Além disso, servem também como parâmetro de controle da qualidade do pó das flores de *Calendula officinalis* L.<sup>24,25</sup>.

Na determinação do teor de cinzas totais do pó, o resultado obtido foi de 12,77%, que se encontra acima do limite especificado por sua monografia, máximo de 10%. A realização deste ensaio permite verificar prováveis impurezas inorgânicas não-voláteis, e quando o teor de cinzas é superior ao permitido, provavelmente, seja indício de procedimentos de colheita e pós-colheita inadequados<sup>26</sup>.

#### Caracterização química e físico-química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

Após o processo de obtenção, as tinturas devem passar por vários ensaios de qualidade dentre eles: identificação, características organolépticas, densidade, resíduo seco, pH e quantificação de compostos marcadores<sup>27</sup>. Todos estes ensaios são importantes para assegurar a qualidade da tintura.

#### Determinação da densidade aparente, pH e resíduo seco

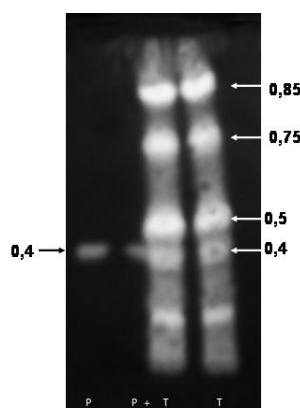
O valor da densidade aparente encontrado foi de 0,89  $\text{g}/\text{cm}^3$ , o qual se manteve dentro do limite preconizado para tinturas 0,87 e 0,98  $\text{g}/\text{cm}^3$ <sup>28</sup>. O valor de pH encontrado para a tintura de calêndula foi de 4,79, o que a caracterizou como ácida. Este resultado representa um dado determinante na escolha dos adjuvantes empregados na formulação fitoterápica, além de ser um fator de influência na estabilidade de formulações<sup>25</sup>. O percentual de resíduo seco da tintura foi obtido a 105 °C expresso em 9,6% (m/m). A determinação do resíduo seco é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do solvente extrator, sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração da tintura<sup>29</sup>.

### Prospecção Química

As análises fitoquímicas visam estabelecer quais classes de metabólitos secundários estão presentes no material vegetal intermediário por meio de reações de identificação específicas para cada classe. Na Tabela 1 estão descritos os resultados obtidos nesta análise para a tintura de *C. officinalis*. A detecção de vários tipos de flavonóides foi um importante indício para confirmar a identidade da matéria-prima em estudo.

### Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O perfil cromatográfico por CCD obtido para tintura de *Calendula officinalis* L. ilustrado na Figura 2, apresentou uma zona cromatográfica fluorescente amarela com valor de Rf (0,4) idêntico ao padrão de rutina na co-cromatografia, além de três zonas cromatográficas fluorescentes azuis que podem ser atribuídas aos ácidos clorogênico, caféico e isoclorogênico com os respectivos valores de Rfs (0,5 - 0,75 - 0,85) idênticos aos valores de Rfs descritos na literatura<sup>20</sup>. A monografia farmacopeica desta espécie recomenda que para a sua caracterização e controle de qualidade, é necessário a determinação da presença, por meio de CCD, do flavonóide rutina e do ácido clorogênico<sup>15</sup>. Portanto, através da análise qualitativa por CCD, foi caracterizado na tintura a presença dos marcadores químicos rutina por co-cromatografia e de ácido clorogênico por comparação com a literatura, comprovando assim a identidade da tintura.



**Figura 2.** Análise por CCD da Tintura de *Calendula officinalis* L. Eluente I: Acetato de Etila-Ácido fórmico-Ácido Acético Glacial-Água (100:11:11:26); revelador NP/PEG. Observação sob luz UV 365 nm; P- Padrão de rutina; T- Tintura de *Calendula officinalis* L.

### Espectrometria na Região do Infravermelho

O padrão de referência rutina apresentou bandas de absorção características dos grupos funcionais de sua estrutura molecular<sup>30,31</sup>. A interpretação do espectro de infravermelho do extrato liofilizado foi realizada com base nos grupos funcionais característicos apresentados pelo padrão de rutina, uma vez que, foi o marcador químico escolhido para a padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. Bandas de absorção semelhantes às apresentadas pelo espectro de absorção da rutina foram identificadas no espectro do extrato liofilizado, tais como em 3408 cm<sup>-1</sup> atribuída a hidroxila fenólica, em 2922 cm<sup>-1</sup> referente à ligação C-H de aromáticos, em 1628 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento do grupo carbonila (C=O), em 1460 cm<sup>-1</sup> e 1406 cm<sup>-1</sup> referentes aos estiramentos de anéis aro-

Classe	Positivo	Negativo	Indicativo
Saponinas		X	
Açúcares redutores	X		
Polissacarídeos		X	
Proteínas e Aminoácidos	X		
Fenóis e Taninos			Indicativo p/ fenóis
Flavonóides	X		
Flavonas / Flavonóis e Xantonas	X		
Leucoantocianidinas / Catequinas e Flavanonas		X	
Flavonóis / Flavanonas / Flavanonóis e Xantonas	X		
Alcalóides	X		
Purinas		X	
Glicosídeos cardíacos		X	
Catequinas		X	
Derivados Benzaquinonas / Naftoquinonas e Fenantraquinonas		X	
Sequitripenolactonas e outras lactonas		X	
Esteróides e Triperpenóides		X	
Azulenos		X	
Carotenóides		X	
Depsídeos e Depsidonas		X	
Derivados de Cumarina		X	
Antraquinona		X	

**Tabela 1.** Prospecção química da tintura de flores de *Calendula officinalis* L.

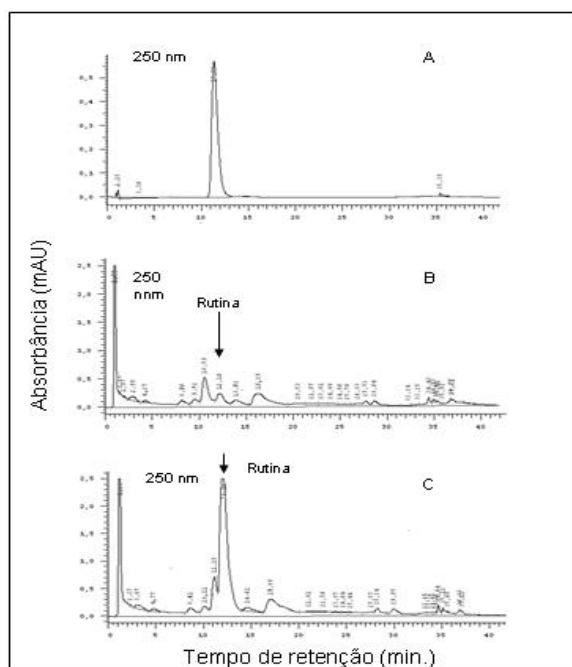
máticos (C=C), e a banda de absorção em 1048  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a ligação C-H do anel. Dessa forma, através da comparação do espectro da rutina (padrão) com o espectro do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* L. foi possível confirmar a presença dos grupos funcionais característicos da rutina no extrato, concretizando-se em mais um parâmetro de caracterização e controle de qualidade da tintura.

### Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### Validação

É imprescindível que se faça a validação da metodologia analítica empregada na quantificação de marcadores químicos em derivados das drogas vegetais, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, a fim de se obter a confiabilidade dos resultados <sup>22,32</sup>.

Após o estabelecimento das condições cromatográficas ideais para a validação, foi realizada a seletividade do método, já que este parâmetro possui a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes <sup>22</sup>. Os resultados dos testes de seletividade apresentados na Figura 3 confirmam a presença de rutina na tintura de calêndula, uma vez que houve um aumento significativo da área do



**Figura 3.** Análise qualitativa por CLAE/UV-DAD da tintura de *Calendula officinalis* L.: Cromatogramas **A**- padrão de rutina (11,33 min), **B**- tintura de calêndula *in natura* (12,16 min), **C**- tintura de calêndula com padrão rutina (12,16 min).

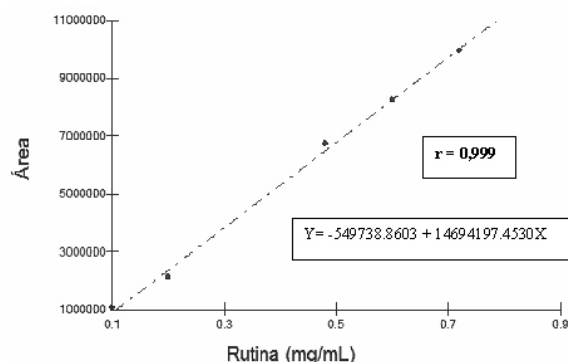
Rutina	n	Tempo de Retenção (x ± dp)
Padrão	6	10,71 ± 0,22
<i>In natura</i>	6	11,00 ± 0,56

**Tabela 2.** Média dos tempos de retenção da rutina padrão e *in natura* na tintura.

pico de tempo de retenção de 12,16 min do cromatograma da tintura *in natura* (B) devido ao aumento da quantidade de rutina detectada pelo equipamento. Na Tabela 2 podem ser observados a média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão (dp) dos tempos de retenção da rutina padrão e rutina *in natura* na tintura. A comparação dessas médias configura-se em mais um parâmetro utilizado para a confirmação da seletividade do método, uma vez que tiveram valores semelhantes.

A linearidade apresentou baixa dispersão dos pontos experimentais no intervalo de concentrações 0,1 a 1,2 mg/ml, com relação de áreas diretamente proporcionais às concentrações dos analitos, que foi caracterizado pelo coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 critério mínimo aceitável pela legislação em vigor <sup>22</sup>. A repetibilidade do método (precisão intracorrida) avaliada a partir do coeficiente de variação das áreas da tintura de calêndula, apresentou valor adequado de 9,05%, segundo as recomendações vigentes, isto é, inferior a 15% <sup>22</sup>.

Para quantificação da rutina na tintura, foi construída uma curva de calibração com padrão de referência rutina ilustrada na Figura 4. A regressão linear foi realizada para obtenção da equação da reta ( $y = a + bx$ ) e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar a correlação entre a concentração e a relação das áreas <sup>22</sup>. Desta forma, com base na equação da reta obtida para a curva de calibração, a concentração de rutina encontrada na tintura de calêndula foi de 463  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 4.** representação gráfica da curva de calibração da rutina.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível comprovar a identidade e obter parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal em estudo, além de certificar a qualidade do derivado vegetal obtido, o que proporcionou a padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. viabilizando seu emprego em formulações fitoterápicas semi-sólidas. Neste contexto, configurou-se de forma evidente, a importância de se adequar todas as etapas envolvidas na produção de medicamentos fitoterápicos às normas de regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Só assim, é possível garantir a população brasileira o acesso a produtos fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia.

**Agradecimentos.** Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio na forma de bolsa.

## REFERÊNCIAS

- Organização Mundial de Saúde (1978) "Declaração de Alma-Ata". Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/promocao/uploadarq/Alma-Ata.pdf>> [Acesso em 20 de junho 2008]
- Yunes, A.R., C.R. Pedrosa & C.V. Filho (2001) *Quím. Nova*. **24**: 147-52.
- ABIFISA. Brasil (2005) "Uma legislação justa para os produtos de origem natural". Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>> [Acesso em 02 de Nov 2008]
- Bauer, R. (1998) *Drug Inf. J.* **32**: 101-10.
- Carvalho, C.M.G., L.R. Prudente, A.C. Pereira, J.R. De Paula & M.T.F. Bara (2006) *Revista Eletrônica de Farmácia* **3**: 53-62.
- Farias, M.R., E.P. Schenkel, A.M. Bergold & P.R. Petrovick (1985) *Caderno de Farmácia* **1**: 73-82.
- Brasil, Ministério da Saúde (2008) *Aprova o Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos*, Portaria nº 2.960 de 09/12/2008. Brasília.
- World Health Organization (2002) "WHO monographs on selected medicinal plants - Vol. 2". Geneva, págs. 35-44.
- Figueredo, Y.N., C. Montero Alarcón, S. Agüero Fernández & A. Muñoz Cernuda (2007) *Lat. Am. J. Pharm* **26**: 548-52.
- Rodrigues, P.O., T.C. Gonçalves & W.B. Silva (2004) *Lat. Am. J. Pharm.* **23**: 27-31.
- Kurkin, V.A. & O.V. Sharova (2007) *Chem. Nat. Compd.* **43**: 216-7.
- Lalla, J.K., P.D Hamrapurkar & K. Gauri (2003) *J. Planar Chromatogr.- Modern TLC* **16**: 298-302.
- Bilia, A.R., M.C. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi & F.F. Vincieri (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 613-24.
- Brasil. MS, ANVISA (2004) *Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápico*. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 48 de 16/03/2004, Brasília.
- Farmacopéia Brasileira, 4ª. ed. (2001) São Paulo: Editora Atheneu.
- Farmacopéia Brasileira 4ª. ed. (1988) São Paulo: Editora Atheneu.
- Farmacopéia Brasileira, 2ª. ed. (1959) São Paulo: Gráfica Siqueira.
- Farmacopéia portuguesa 7. ed. (2003) Lisboa: Infarmed.
- Barbosa, W.L.R. (2001) "Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais". Disponível em: <<http://www.ufpa.br/rcientifica>>, v. 4 [Acesso em 20 de Maio 2007].
- Wagner, H. & S. Bladt (2001) "Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas". 2ª. Ed. Berlin: Springer.
- Bilia, A.R., D. Salvini, G. Mazzi & F.F. Vincieri (2001) *Chromatographia* **53**: 210-5.
- Brasil, MS, ANVISA(2003) *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos* Resolução - RE nº 899 de 29/05/2003.
- Brandão, F.C., L.F. Berti, M.A.S. Silva & H.K. Stulzer (2008) *Lat. Am. J. Pharm.* **27**: 560-7.
- Migliato, K.F., R.R.D. Moreira, J.C.P. Mello, L.V.S. Sacramento, M.A. Corrêa & H.R.N. Salgado (2007) *Rev. Bras. Farmacog.* **17**: 94-101.
- Maciel, R.L., L.M. Moreira-Campos, B.C. Silva & M.G.L. Brandão (2006) *Rev. Bras. Farmacog.* **16**: 99-104.
- Sharapin, N. (2000) "Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápico". Santafé de Bogotá: Cytel, págs. 145-57.
- Fonseca, P. & A.P.L. Librandi (2008) *Rev. Bras. Cienc Farm.* **44**: 271-7.
- Prista, L.N., A.C. Alves & R.M.R. Morgado (1990) *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3º ed, v. II, págs 183-207
- Oliveira, A.H. & A.A. Berretta (2007) *Revista Eletrônica de Farmácia* **2**: 169-74.
- Deng, W.; H. HE, X. Fang, & J. WU (1998) *Radiat. Phys. Chem.* **53**: 629-33.
- Jin, G.P., Q.Z. Chen, Y.F. Ding & J.B. He (2007) *Electrochim. Acta.* **52**: 2535-41.
- Netto, E.M., N.S.M.S.A.Q. Shuqair, E.E. Balbino & A.C. Carvalho (2006) *Revista Fitos* **1**: 9-17.