



# Validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Juliana Ziliotto<sup>1</sup>; Cristina Farina<sup>2</sup>; Kellen Cristhina Borges de Souza<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Curso de Farmácia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório Farmacêutico Vitamed, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica por espectrofotometria no UV para a quantificação de flavonóides totais, expressos em vitexina, em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L. O método foi desenvolvido a partir da metodologia de doseamento de flavonóides totais descrita na monografia do extrato seco de *P. incarnata* L, disponível na Farmacopeia Britânica (2010). A validação da metodologia analítica de doseamento foi realizada de acordo com a Anvisa RE N° 899/2003 e diretrizes da International Conference on Harmonization. O método mostrou-se seletivo, pois não houve interferência dos adjuvantes na leitura das absorbâncias nas soluções analisadas. Apresentou coeficiente de correlação linear (r) de 0,9999, confirmando a linearidade do método. Os valores de desvio padrão relativo, obtidos tanto para precisão, nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, quanto para exatidão não excederam o máximo de 15% determinado nos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos, considerando a complexidade da matéria-prima vegetal.

**Palavras-chave:** *Passiflora incarnata* L. Validação de metodologia analítica. Flavonoides. Espectrofotometria no ultravioleta.

## INTRODUÇÃO

A padronização de fitoterápicos e a garantia da sua eficácia e segurança requerem métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação de seus marcadores e de substâncias potencialmente tóxicas (Chabariberi et al., 2009).

Os principais compostos bioativos presentes na *P. incarnata* L. são os flavonoides C-glicosilados derivados de apigenina e luteolina (vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosídeo, entre outros), que constituem atualmente a melhor opção de marcadores. Também estão presentes alcaloides do tipo harmano, como harmana, harmina, harmalina, harmol, harmalol (Muller, 2005; Muller, 2006; Witcht, 2004; Kamaldeep et al., 2004; Newall et al., 1996).

A *P. incarnata* L. consta em monografias das Farmacopeias Helvética (Pharmacopoeia Helvética, 1987), Alemã (Deutsches Arzneibuch, 1997), Europeia (European Pharmacopoeia, 2005), Francesa (Pharmacopée Française, 2007) e Britânica (British Pharmacopoeia, 2011).

A Farmacopeia Britânica (British Pharmacopoeia, 2011) apresenta monografia para o extrato seco de *P. incarnata* L. na qual preconiza teor mínimo de 2% de flavonóides totais, expressos em vitexina. A extração de flavonoides do extrato seco de *P. incarnata* L. é feita com etanol 60% (v/v), seguido da reação de complexação com solução oxalo-bórica, sendo que o teor de flavonoides totais expressos na forma de vitexina é medido em UV em 401 nm (British Pharmacopoeia, 2011).

O objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que é apropriado para sua finalidade (ICH, 1996). Os testes utilizados para validação são classificados em quatro categorias de acordo com sua finalidade. Para cada categoria é exigido um conjunto de testes necessários para validar a metodologia analítica. Os testes quantitativos para a determinação do fármaco em produtos farmacêuticos ou matérias-primas pertencem à categoria I, em que são exigidos os parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez (Brasil, 2003).

O desenvolvimento de métodos para quantificação dos componentes ou marcadores de fitoterápicos tem sido acompanhado do processo de validação a fim de disponibilizar uma metodologia alternativa para análises descritas em Farmacopeias ou oferecer uma proposta para quantificação de produtos caracterizados pela ausência de metodologias analíticas (Costa, 2008).

*Autor correspondente:* Profa. Dra. Kellen C. B. de Souza - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Rua Sarmento Leite, 245 - CEP:90050-170 - Porto Alegre RS - Brasil - telefone/fax: (51) 3303-8741 - e-mail: kellens@ufcspa.edu.br

A validação de metodologia analítica para fitoterápicos deve ser feita de acordo com o disposto na Resolução RE 899/03, referente ao guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, porém, os resultados podem seguir os níveis de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade da matéria-prima vegetal (Brasil, 2003).

A inexistência de métodos oficiais para a quantificação de cápsulas de *Passiflora incarnata* L. justifica o desenvolvimento e validação de método analítico, de maneira a auxiliar os laboratórios no controle de qualidade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica por espectrofotometria no UV para a quantificação de flavonóides totais expressos em vitexina, em cápsulas de *Passiflora incarnata* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

#### Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: metanol, ácido fórmico anidro, ácido acético glacial, ácido bórico e ácido oxálico, etanol. Utilizou-se água obtida por osmose reversa.

#### Matéria-prima e produto acabado

Extrato seco de *Passiflora incarnata* L. 3,5% flavonóides (adjuvante de secagem: amido de milho 50%). Lote: 300400524. Validade: 12/08/2012 (Sanrisil S.A. Indústria e Comércio).

Cápsulas de *Passiflora incarnata* L. 290mg (Cada cápsula contém 10,15mg de flavonóides totais expressos em vitexina. Excipientes: celulose microcristalina 101, dióxido de silício coloidal, talco).

### Métodos

#### I. Identificação e quantificação de flavonóides no extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Para a matéria-prima (extrato seco), realizou-se identificação dos marcadores por cromatografia em camada delgada (CCD) e determinação do teor de flavonóides totais expressos em vitexina, por espectrofotometria no UV-Visível (British Pharmacopeia, 2011). Realizou-se a confirmação do método de doseamento da matéria-prima através da análise de precisão (repetibilidade e precisão intermediária). Posteriormente, comparou-se o aspecto visual do extrato seco com o descrito na monografia vigente. Por fim, determinou-se a umidade através do método gravimétrico (British Pharmacopeia, 2011).

#### II. Doseamento de flavonóides totais em cápsulas de *Passiflora incarnata* L.

Pesou-se 20 cápsulas individualmente. Retirou o conteúdo das cápsulas e, posteriormente, pesou-se os

respectivos invólucros vazios. O peso médio foi determinado pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e o invólucro vazio. O conteúdo das cápsulas foi misturado em gral de vidro.

**Solução estoque:** Pesou-se em balança analítica (Marte – Modelo AY220), a partir da mistura do pó das cápsulas, o equivalente a 50 mg de extrato seco. Transferiu a amostra para um balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se aproximadamente 50 mL de etanol 60%. Agitou-se manualmente a solução. O volume foi completado com etanol 60% e, em seguida, filtrou-se a solução em papel filtro.

**Solução teste:** Para béquer de 10 mL foram transferidos 5,0 mL da solução estoque, com auxílio de pipeta volumétrica. O béquer foi levado para banho-maria até completar a evaporação do solvente. Retomou o resíduo com 8,0 mL de solução metanólica de ácido acético (10 partes de metanol para 100 partes de ácido acético) e transferiu para balão volumétrico de 25 mL. Logo após, adicionou-se mais 3,0 mL de solução metanólica de ácido acético no béquer para retirar completamente o resíduo e transferiu novamente para o balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 10 mL de solução oxálo-bórica (25,0 g/L ácido bórico e 20,0 g/L de ácido oxálico em ácido fórmico anidro), e diluiu para 25 mL com ácido acético glacial. Este último procedimento foi realizado em triplicata.

**Solução de compensação (branco):** Para béquer de 10 mL foram transferidos 5,0 mL da solução estoque, com auxílio de pipeta volumétrica. O béquer foi levado para banho-maria até completa evaporação do solvente. Retomou-se o resíduo com 8,0 mL de solução metanólica de ácido acético (10 partes de metanol para 100 partes de ácido acético) e transferiu para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica de ácido acético no béquer para retirar completamente o resíduo e transferiu-se novamente para o balão volumétrico de 25 mL. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de ácido fórmico anidro e diluiu-se para 25 mL com ácido acético glacial.

Ambas as soluções foram mantidas em repouso por 30 minutos. Com auxílio de espectrofotômetro UV - visível (1650PC – Shimadzu) obteve-se o espectro de absorção da amostra. As medidas das absorbâncias foram realizadas em 401 nm, usando a solução de compensação para zerar o aparelho.

Calculou-se o teor percentual de flavonóides totais, expressos em vitexina, a partir da seguinte equação:

$$TFT = \frac{Ax0,8}{m}$$

Onde: A é a absorbância medida em 401 nm, e m é a massa da amostra analisada em g.

#### III. Validação da metodologia quantitativa

**Seletividade:** Foi avaliada a partir da análise dos espectros de absorção das soluções, obtidos em espectrofotômetro, empregando-se uma faixa de comprimento de onda de 350 a 500 nm. Foram obtidos espectros de absorção da solução teste (extrato seco + adjuvantes), solução do analito (extrato seco) e de uma

solução preparada somente com os adjuvantes das cápsulas mantendo-se as proporções de cada um deles.

**Linearidade:** Para construção da curva de calibração, preparou-se cinco concentrações diferentes do analito (extrato seco), no intervalo de 50% a 150% da concentração teórica do teste, equivalentes a 0,05 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,150 mg/mL, em triplicata. Após realização do procedimento conforme o item II, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 401 nm. Realizou-se a análise de regressão linear, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear da reta. A linearidade foi avaliada através do tratamento dos dados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas de calibração do extrato seco.

**Precisão:** A precisão foi avaliada em níveis de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de três concentrações (75, 100, 125%) realizadas em triplicata. A precisão intermediária foi determinada em dois dias e por dois analistas diferentes, em triplicata, nas três concentrações utilizadas na repetibilidade. Os valores de desvio padrão relativo foram utilizados para avaliar este parâmetro.

**Exatidão:** A exatidão do método foi avaliada a partir da adição do analito (extrato seco) na amostra, em três concentrações, baixa, média e alta (75, 100, 125%, respectivamente). Calculou-se a taxa de recuperação das quantidades de analito adicionadas na amostra.

## RESULTADOS

### Identificação e quantificação de flavonóides no extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

O extrato seco analisado apresentou-se como um pó de aspecto homogêneo e coloração marrom esverdeada, de acordo com as características determinadas para o mesmo. No perfil cromatográfico obtido por CCD para a solução teste (extrato seco), observaram-se quatro zonas fluorescentes de coloração amarelo (Rf 0,31), verde (Rf

0,81), amarelo (Rf 0,87) e verde (Rf 0,92). Para as soluções de referência verificou-se Rf 0,91 e coloração verde para vitexina, Rf 0,63 e coloração amarela alaranjada para rutina e Rf de aproximadamente 0,86 e coloração amarelo alaranjado para o hiperosídeo.

A confirmação do método analítico de doseamento para o extrato seco foi realizada pelo teste de precisão (repetibilidade e precisão intermediária), na qual se obteve em todas as amostras analisadas DPR < 4%. O extrato seco apresentou  $6,07 \pm 0,27$  % de umidade.

### Validação da metodologia quantitativa

**Seletividade:** Os espectros de absorção referentes às varreduras das soluções analisadas para seletividade do método foram sobrepostos e estão representados na Figura 1. Pode-se observar que a solução contendo apenas os adjuvantes utilizados na formulação das cápsulas não apresentou picos de absorção no comprimento de onda de 401 nm, utilizado para quantificar o teor de flavonóides totais expressos em vitexina. Da mesma forma, observa-se que os picos resultantes para a solução teste, (adjuvantes+extrato seco) e solução do analito (extrato seco), mostram-se praticamente iguais, evidenciando novamente que não há interferência significativa dos componentes da matriz na leitura das soluções.

**Linearidade:** A partir das absorvâncias foi construído gráfico de concentração versus absorvância média (Figura 2) e obteve-se a equação da reta pela regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, bem como o seu correspondente coeficiente de correlação linear (r) (Tabela 1).

**Precisão:** Os resultados obtidos com o parâmetro repetibilidade estão dispostos na Tabela 2. Na precisão intermediária, os resultados obtidos para o analista A e B em diferentes dias estão expressos na Tabela 3. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no Dia 1 e Dia 2 por analistas diferentes (A e B).

**Exatidão:** Os resultados de recuperação do analito (extrato seco) adicionado à matriz, nas diferentes concentrações, estão representados na Tabela 5.

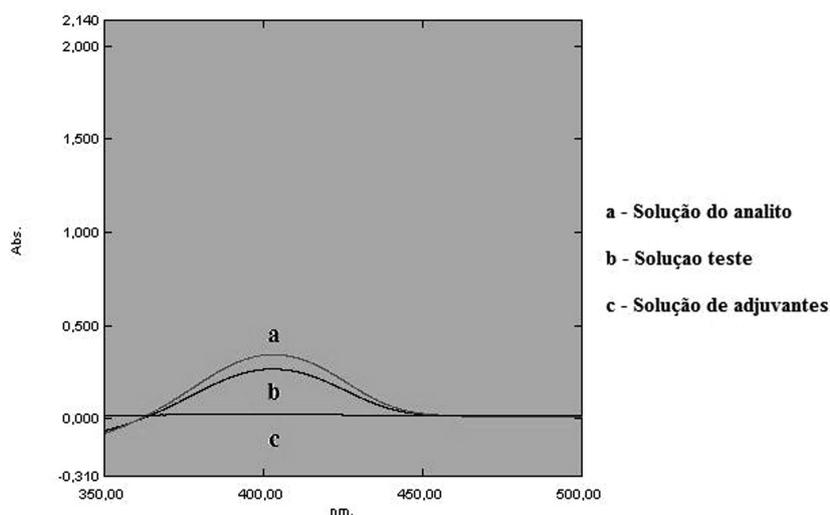


Figura 1. Espectros de absorção obtidos para solução de adjuvantes, solução teste (adjuvantes + extrato seco de *Passiflora incarnata* L) e solução do analito (extrato seco de *Passiflora incarnata* L., empregando uma faixa de comprimento de onda de 350 a 500 nm.

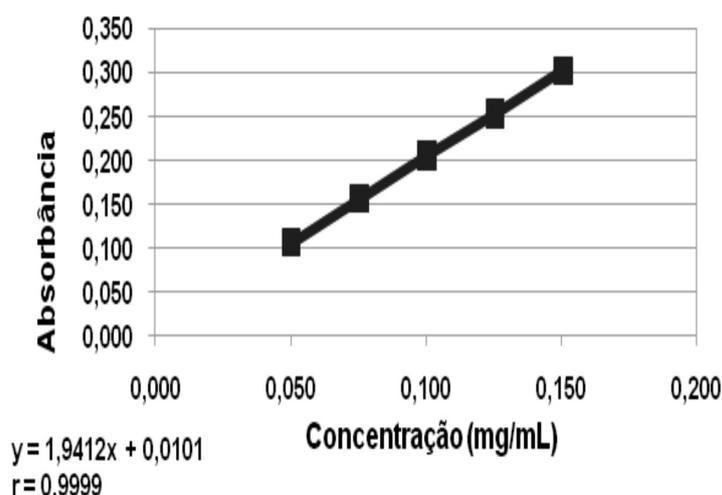


Figura 2. Curva de calibração do método realizado para o extrato seco de *Passiflora incarnata* L. obtida pela análise das soluções do analito (extrato seco) nas concentrações de 50 a 150% da concentração teórica do teste versus absorbância média.

Tabela 1. Resultados do tratamento estatístico da curva de linearidade do extrato seco de *Passiflora incarnata* L., apresentando os parâmetros de coeficiente angular, coeficiente de correlação e equação da reta.

Parâmetros	Valores obtidos
Coefficiente angular (a)	1,9412
Coefficiente angular (b)	0,0101

Tabela 2. Resultados da avaliação do parâmetro de repetibilidade do método de doseamento para cápsulas de *Passiflora incarnata* L. nas diferentes concentrações.

Conc.	TFT (%)	Média TFT (%)	DP	DPR (%)
	2,4751			
75%	2,4425	2,4560	0,0170	0,6933
	2,4503			
	3,3587			
100%	3,4019	3,3971	0,0363	1,0679

TFT(%): Teor de flavonoides totais expressos em vitexina; DP: Desvio padrão; DPR(%): Desvio padrão relativo

Tabela 3. Resultados da avaliação da precisão intermediária do método de doseamento para cápsulas de *Passiflora incarnata* L. obtidos para o analista A e analista B em 2 dias diferentes. Tabela

Conc.	Analista A		Analista B			
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
	TFT(%)	TFT(%)	DPR(%)	TFT(%)	TFT(%)	DPR(%)
75%	2,4149	2,5950	5,0829	2,4991	2,4560	1,2302
100%	3,3078	3,3686	1,2861	3,3158	3,3971	1,7126
125%	3,9068	3,9254	0,3358	3,8713	3,9471	1,3719

TFT(%): Teor de flavonoides totais expressos em vitexina; DP: Desvio padrão; DPR(%): Desvio padrão relativo

Tabela 4. Resultados da avaliação da precisão intermediária do método de doseamento para cápsulas de *Passiflora incarnata* L. obtidos no Dia 1 e Dia 2 com 2 diferentes analistas.

Conc.	Dia 1		Dia 2			
	Analista A	Analista B	Analista A	Analista B	Analista A	Analista B
	TFT(%)	TFT(%)	DPR(%)	TFT(%)	TFT(%)	DPR(%)
75%	2,4149	2,4991	2,4221	2,5950	2,4560	3,8920
100%	3,3078	3,3158	0,1703	3,3686	3,3971	0,5969
125%	3,9068	3,8713	0,6448	3,9254	3,9471	0,3913

TFT(%): Teor de flavonoides totais expressos em vitexina; DP: Desvio padrão; DPR(%): Desvio padrão relativo

Tabela 5. Resultados da recuperação realizado para as concentrações de 75%, 100% e 125% de extrato seco de *Passiflora incarnata* L. adicionadas à matriz

Conc.	TFT Teórico(%)	TFT Real(%)	Recuperação(%)	DPR(%)
75%	2,417	2,512	103,91	1,4481
100%	3,234	3,325	102,83	0,9051
125%	3,862	3,867	100,13	0,9085

TFT(%): Teor de flavonoides totais expressos em vitexina; DPR(%): Desvio padrão relativo

## DISCUSSÃO

O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (Borges et al., 2005). O extrato seco apresentou um teor de umidade de 6,07%, acima do preconizado em monografia (British Pharmacopeia, 2011) que admite no máximo 5% de umidade.

Durante a realização das análises, observou-se que o extrato seco de *Passiflora incarnata* L. apresentou comportamento bastante higroscópico, por se aderir

facilmente às paredes do frasco e espátulas utilizadas. Considerando a influência da umidade dos materiais sólidos em seu comportamento tecnológico e na sua estabilidade, essa característica de higroscopicidade observada deve ser bem avaliada, principalmente na seleção das operações produtivas e na manipulação e seleção das condições de armazenamento, em nível de ambiente e de material de acondicionamento e embalagem (Mendez et al., 2011).

A otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluido a ser submetido a secagem são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação. O uso de adjuvantes tecnológicos influencia de maneira decisiva no aumento do rendimento do processo de secagem, além de contribuir positivamente sobre a recomposição em água do produto (Vasconcelos et al., 2005).

A fim de melhorar esse parâmetro é aconselhável que o extrato seco seja acondicionado em local seco e arejado, com controle de umidade ambiental, pois a umidade residual pode influenciar em alguns fatores tecnológicos como a obtenção de uma mistura não uniforme, dificuldade no processo de tamisação, fluxo inadequado, problemas durante a encapsulação e instabilidade da forma farmacêutica final.

Produtos intermediários, como extratos vegetais, são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como nos bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto à composição das matrizes biológicas (Costa, 2008). Desta maneira, os parâmetros de validação do método de doseamento de cápsulas de *Passiflora incarnata* L. foram avaliados empregando os critérios de aceitação para métodos bioanalíticos.

A complexidade de sua composição favorece a grande variabilidade na qualidade das drogas obtidas a partir de uma mesma espécie vegetal. Tal característica está relacionada com diversos fatores, referentes às condições do local de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento da matéria-prima vegetal. Desta forma, as matérias-primas vegetais apresentam, com frequência, grandes variações entre fornecedores, justificando a necessidade de padronização destes produtos (Fischer, 2007).

Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r) da curva de calibração deve ser superior ou igual a 0,98 (Brasil, 2003). Obteve-se para o extrato seco um valor médio de 0,9999 considerando o método como linear, ou seja, a curva obtida demonstrou que as absorbâncias determinadas no método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foram diretamente proporcionais às concentrações das soluções, no intervalo correspondente a 50% e 150% da concentração de trabalho.

O método analítico mostrou-se seletivo, pois foi verificado através dos espectros de absorção, que os componentes da matriz (adjuvantes) não absorvem no comprimento de onda 401nm, e, portanto não interferem na determinação do analito. Desta forma, conclui-se que o método avaliado é capaz de determinar a quantidade de flavonóides totais em presença de componentes da matriz (ICH, 1996; Brasil, 2003).

No parâmetro de precisão, o método apresentou uma boa repetibilidade, visto que o DPR(%) foi inferior ao especificado de 15%. Em relação à precisão intermediária, os valores de DPR(%) também se apresentaram dentro dos limites de aceitação. Demonstrou-se que o método é preciso, ou seja, é capaz de proporcionar resultados próximos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ICH, 1996; Brasil, 2003).

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação. Para as concentrações de 75%, 100% e 125% obtiveram-se recuperação de 103,91%, 102,83% e 100,13%, e DPR de 1,4481%, 0,9051% e 0,9585% respectivamente. Os resultados obtidos estão de acordo com o preconizado em guias nacionais (Brasil, 2003) e internacionais (ICH, 1996) em que o DPR (%) não deve exceder 15% para métodos quantitativos. Em relação à recuperação do analito, porcentagens próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores desde que a recuperação seja precisa e exata. Desta maneira, o método demonstrou-se exato para a finalidade determinada.

## ABSTRACT

*Validation of analytical method for assay of total flavonoids in capsules containing dry extract of Passiflora incarnata L.*

**The aim of this study was to develop and validate an analytical method using UV spectrophotometry to determine total flavonoids, expressed in vitexin, in capsules containing a dry extract of *Passiflora incarnata* L. The analytical method was based on the spectrophotometric assay described in the British Pharmacopoeia (2010), for the dry extract of *P. incarnata* L. The validation of this method of quantitation was done in accordance with ANVISA resolution 899/2003 and the International Conference on Harmonization guidelines. The method was selective, because there was no interference from additives in the reading of the absorbance of solutions analyzed. It showed a linear regression correlation coefficient (r) of 0.9999, confirming the linearity of the method. The values of relative standard deviation calculated for precision (both repeatability and intermediate precision) and for accuracy did not exceed the maximum of 15% allowed in the acceptance criteria for bioanalytical methods, considering the complexity of the plant raw material.**

*Keywords: Passiflora incarnata* L. Analytical methodology validation. Flavonoids. UV spectrophotometry

## REFERÊNCIAS

Borges DB, Farias MR, Simões CMO, Schenkel EP. Comparação das metodologias da Farmacopeia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. Rev Bras Farmacogn. 2005;15(3):229-36.

- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.lawes.com.br/legislacao2/899.pdf>. Acesso em: 21 de abril de 2011.
- British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia Commission. London: The Stationery Office; 2011. p. 3592-3.
- Chabariberi RAO, Pozzi AC, Zeraik ML, Yariwake, JH. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (*Passifloraceae*) e comparação com método CLAE-UV. Rev Bras Farmacogn. 2009;19(4):860-4.
- Costa ART. Aplicação do ensaio de dissolução na avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos à base de *Passiflora sp.* [Dissertação]. Goiânia: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás; 2008.
- Deutsches Arzneibuch (DAB 1997). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 1997.
- European Pharmacopoeia 5.0. 5. ed. Supplement Strasbourg: Council of Europe; 2005.
- Farmacopeia Brasileira. vol. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010. 524 p.
- Fischer DCH. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2007.
- International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities – Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH; 1996.
- Kamaldeep D, Sanju D, Anupam S. *Passiflora*: a review update. J Ethnopharmacol. 2004;(94):1-23.
- Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M, Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. J Pharm Biomed Anal. 2005;(37):399-403.
- Muller SD. Determinação de alcalóides e flavonóides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá-Doce. [Dissertação]. Itajaí: Centro de Educação e Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí; 2006.
- Mendez ASL, Simionato NO, Valduga AT, Reginatto FH. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2011;32(1):105-11.
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal medicines: a guide for healthcare professionals. London: The Pharmaceutical Press; 1996. 296 p.
- Pharmacopée Française 2007. 10th. ed. Paris: Ministère de la Santé; 2007.
- Pharmacopoeia Helvética, 7<sup>th</sup>. ed. Vol. 14.(Ph.Helv.VII). Bern: Office Central Fdral des Imprints et du Matriel; 1987.
- Vasconcelos EAF, Medeiros MGF, Raffin FN, Moura TFAL. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Rev Bras Farmacogn. 2005;15(3):243-9.
- Witchtl M. Herbal Drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. 3<sup>rd</sup> ed. Stuttgart, Germany: Medpharm GmbH Scientific Publishers; 2004.

Recebido em 8 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 6 de junho de 2012.