DALL

Soluções Analíticas e Empresariais

www.dallsolucoes.com.br

Segurança em Serviços Laboratoriais e Regulatórios para Produtos Fitoterápicos: **Metais pesados, Micotoxinas e Agrotóxicos/Pesticidas - Aspectos Globalizados**

Laerte Dall´Agnol
Especialista em Produtos Naturais DALL Soluções

Dr. Michael Schwarz
PhytoLab GmbH & Co. KG

Ensaios
NBR ISO/IEC
17025

CRL 0820

REBLAS

A **DALL Soluções Analíticas e Empresariais** é uma empresa nacional fundada em Junho de 2011.

VISÃO

Ser um centro de excelência em pesquisa avançada na área de Produtos Naturais e Fitoterápicos.

*** Possui parceria técnico científica com um dos maiores laboratórios da Europa na área de analise de produtos naturas, o **Laboratório Phytolab** situado na Alemanha e, dessa forma, pode oferecer um diversificado escopo de serviços a seus clientes com excelente qualidade cientifica.

VISÃO GLOBAL

- **Introdução**
(Qualidade dos medicamentos, Farmacopeia Europeia; monografias gerais)
- **Metais pesados**
(Ocorrência, limites, estudo sobre o conteúdo em drogas fitoterápicas, outros regulamentos)
Micotoxinas
(Ocorrência, monografias gerais, resultados do estudo, influência do GACP na ocratoxina A)
- **Pesticidas**
(Monografias gerais, Ph. Eur. 2.8.13, EC 396/2005, Base de dados de pesticidas, Lista de alocação, Âmbito do teste, Variedade de métodos, Efeitos da matriz)
- **Gerenciamento de risco**
(Dificuldades com produtos fitoterápicos, Fatores de qualidade, Referências Contaminantes, Amostragem)
- **Outros contaminantes**
(Radioatividade, antraquinona, PAH, Alcaloides Pirrolizidinicos)

INTRODUÇÃO

A utilização segura de medicamentos é garantida através de informações detalhadas sobre qualidade, eficácia e segurança.

Os medicamentos à base de plantas - em contraste com as drogas sintéticas - consistem numa mistura altamente complexa de compostos.

Apesar da extensa pesquisa, apenas para poucas plantas existe uma ligação entre constituintes individuais e a eficácia do produto.

INTRODUÇÃO

Uma base uniforme para avaliar a eficácia e a segurança foi formada na Alemanha em 1982 pelo estabelecimento da Comissão E.

Em 2006, a EMA foi desenvolvida - baseada em registros existentes - monografias que contém informações sobre **produção, eficácia e segurança**.

Estas monografias comunitárias substituem as monografias da Comissão E e constituem a base para a harmonização na Europa.

INTRODUÇÃO

A qualidade dos medicamentos está estabelecida na Farmacopeia Europeia (Ph.Eur.) ou nas Farmacopéias Nacionais.

As Farmacopéias sempre definem os parâmetros de qualidade **com base no conhecimento científico mais recente.**

A Ph.Eur. orienta-se nas *Community Monographs* ("a Farmacopéia segue a autorização"), **mas pode estabelecer padrões de qualidade mais elevados do que os originalmente formulados.**

A Ph.Eur. concentra-se em **parâmetros de qualidade das matérias primas**, **não de produtos acabados**. Seu objetivo é impedir o uso de matérias-primas de má qualidade.

METAIS PESADOS

- Ocorrência e Origem
- Limites na Monografia Geral
- Evolução dos limites nos regulamentos
- Requisitos do método
- Exceções para extratos
- Limites específicos em monografias individuais
- Variedade de métodos analíticos
- Outras regulamentações relevantes

METAIS PESADOS - Origem

Os elementos chumbo, cádmio e mercúrio são **compostos naturais da superfície da terra** e são absorvidos pelas plantas através solo.

Além disso, os elementos mencionados **desempenham um papel importante em processos e aplicações técnicas** e, como contaminantes antropogênicos, encontram seu caminho no ar, na água e no solo, e daí também para os alimentos.

Fontes comuns são de resíduos de mineração e industriais; emissões veiculares; baterias de chumbo-ácido; fertilizantes; tintas; madeiras tratadas; infraestrutura de abastecimento de água muito antiga.

O chumbo é o contaminante tóxico mais relevante entre os metais pesados.
Como componente do tetra-etil, o chumbo foi amplamente utilizado na gasolina.

Algumas plantas acumulam metais pesados mais do que outras.

METAIS PESADOS - Limites

General Monograph on Herbal Drugs

Heavy metals (*2.4.27*). Unless otherwise stated in an individual monograph or unless otherwise justified and authorised:

- *cadmium*: maximum 1.0 ppm;
- *lead*: maximum 5.0 ppm;
- *mercury*: maximum 0.1 ppm.

Where necessary, limits for other heavy metals may be required.

METAIS PESADOS – Definindo os Limites…

• Os níveis máximos permitidos de metais pesados foram especificados apenas no Ph.Eur. Monografias “Kelp“ (Pb, Cd, Hg, As) e “Óleo de linhaça“ (Cd).

• O “ *Draft of a Recommendation on Heavy Metals in Herbal Drugs* ” estabelece limites para o chumbo, cádmio e mercúrio para drogas vegetais (aplicadas pelas autoridades alemãs).

METAIS PESADOS – Definindo os Limites…

A publicação "***Heavy Metals in Herbal Drugs***" (Dr. Lothar Kabelitz, The European Journal of Herbal Medicine, volume 4, número 1, 1998) apresenta os resultados da investigação de mais de 12.000 amostras testadas para chumbo, cádmio e mercúrio.

Esta avaliação foi atualizada com dados de **6 empresas** (Salus-Haus, Martin Bauer, Kneipp Werke, Finzelberg, Frutarom, Wala Heilmittel), considerando amostras analisadas em 2002-2005.

Os resultados apresentados nesse *paper* demonstram que os limites recomendados, **geralmente, não são viáveis.**

METAIS PESADOS – Avaliação do estudo - **a partir dos resultados**

- Sugestões para níveis máximos de metais pesados em drogas à base de plantas medicinais podem ser formulados com base em resultados analíticos.

- Se houver uma quantidade adequada de dados disponíveis, o estabelecimento de um teor máximo para metais pesados de drogas medicinais, com base em um percentil 90º é estatisticamente significativo.

➢ Em estatística descritiva, os **percentis** são medidas que dividem a amostra (por ordem crescente dos dados) em 100 partes, cada uma com uma percentagem de dados aproximadamente igual.

METAIS PESADOS – Limites máximos praticáveis de cádmio em medicamentos fitoterápicos

Herb	90th perc.in mg/kg		90th perc. in mg/kg
Birch leaves	0.7	Fumitory	1.1
Goldenrod	0.9	St. John´s wort	1.3
Kava Kava rhizome	0.6	Dandelion root and herb	0.6
Dandelion herb	0.7	Lungwort	0.8
Mallow herb	1.2	Helichrysum flower	0.7
Spinach leaves	0.9	Wild pansy	1.0
Fucus	1.0	Tormentil	2.1
Willow bark	1.8	Citronella grass	0.6

METAIS PESADOS – Vários limites regulamentados no passado....

Heavy Metal mg/kg	Pb	Cd	Hg	As
German Ministry Health (1991)[1]	5	0.2	0.1	
Ph. Eur. Monograph Fucus[1]	5	4	0.1	90
Ph. Eur. Monograph Linseed[1]		0.5		
BAH (2002)[1]	10	1	0.1	5
(EC) No 1881/2006				
Fresh herbs [2]		0,2		
Vegetables [2]	0.3/0,1	0.2		
Food supplements (drafted) [2]	1.0	0.50	0.20	
German national regulation (RHmV)[1]				
Tea			0.02	
Tea like Products			0.01	

METAIS PESADOS – **Monograph on Herbal Drug Extracts**

applicable comply with the requirements of any relevant monograph in the European Pharmacopoeia. Where justified, herbal drugs used for the production of extracts may exceed the limits for heavy metals specified in the monograph *Herbal drugs (1433)* provided that the resulting extract satisfies the requirements for heavy metals (see Tests).

pesticide residues (*2.8.13*) in the extracts may be necessary. Where a test for heavy metals is carried out, the same limits for heavy metals as those given in the monograph *Herbal drugs (1433)* are applicable to extracts unless otherwise stated in an individual extract monograph or unless otherwise justified and authorised.

METAIS PESADOS – Metais pesados na Ph. Eur.

- Ph.Eur. Monograph 2.4.27 fornece métodos de teste para 7 metais pesados (Pb, Cd, Hg, As, Cu, Fe, Ni), mas não especifica limites.

- Limites para Pb (5,0 ppm), Cd (1,0 ppm), Hg (0,1 ppm) descritos em monografias gerais de “Herbal Drugs”

- Limite superior para Cd em monografias para Salgueiro (2,0 ppm), tormentil (2,0 ppm), Fucus (4,0 ppm) e Fumária (1,5 ppm)

- Limite inferior para Cd em sementes de linhaça (0,5 ppm)

- Fucus: Limite para As (90 ppm); Pb e Hg são mencionados - limite é idêntico.

- Uma variedade de métodos é mencionada: AAS, ICP-AES, ICP-MS;

- Critérios de validação são descritos, por ex. LOQ < limite de especificação.

METAIS PESADOS – Outras regulamentações relevantes

- **ICH Q3D:**
  - contém limites harmonizados para um total de 24 elementos
  - não aplicável a produtos à base de plantas
  - limites baseados no cálculo de EDP (exposição diária permitida) em contraste com os limites de matéria-prima aplicados pela Ph. Eur.

- **Regulamento CE1881 / 2006:**
  - contém limites para Pb e Cd em legumes, ervas frescas, frutas , leite, peixe, carne…
  - contém limites para Hg apenas para frutos do mar

MICOTOXINAS

- Significado e ocorrência
- Informação das monografias gerais
- Métodos para micotoxinas na Ph. Eur.
- Limites em monografias gerais e individuais
- Implicações na prática
- Fungos formando micotoxinas
- Regulamento da Comissão1881 / 2006
- Resultados de monitoramento
- Gerenciamento de riscos e importância das BPA

MICOTOXINAS – Significancia e Abrangencia

- Produtos metabólicos de bolores, característicos de cada espécie, na sua maior parte **termicamente estáveis.**

- **Toxicidade aguda:** danos no fígado, rins, sistema nervoso, pele, membranas mucosas, sistema imunológico.

- **Toxicidade crônica:** pode provocar câncer, pode causar anormalidades congênitas e malformações no embrião.

- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO):

➢ 25% da produção mundial de alimentos
➢ 20% da colheita de cereais na UE

está contaminada com micotoxinas.

MICOTOXINAS – Monografias Gerais

Óleos Graxos Vegetais:

- REFINAR...

O objetivo do refino é remover impurezas e contaminantes do óleo com o menor dano possível aos triglicerídeos e com perda mínima de óleo. O conteúdo das seguintes substâncias é reduzido

- pigmentos como o gossipol (em óleo de semente de algodão) **ou micotoxinas como a aflatoxina** (principalmente em sementes de amendoim);

MICOTOXINAS – Monografias Gerais

Produtos Alergênicos

Fungos: contaminantes biologicamente ativos (como micotoxinas) devem ser minimizados e qualquer presença justificada.

Medidas apropriadas devem ser implementadas para evitar a contaminação por cepas de mofo estrangeiras.

MICOTOXINAS – Monografias Gerais

Medicamentos à base de plantas:

....

Quando necessário, os medicamentos à base de plantas devem cumprir com outros testes, como, por exemplo:

...

Aflatoxina B1: quando aplicável, limites para aflatoxinas podem ser requeridos.

Ocratoxina A: quando aplicável, limites para a ocratoxina A podem ser requeridos.

...

MICOTOXINAS – Monografias Gerais

Medicamentos à base de plantas para preparações homeopáticas:

... Aflatoxinas: limites para aflatoxinas podem ser necessários.

MICOTOXINAS – Monografias Gerais

Extratos:

Quando aplicável, como resultado da análise do fármaco à base de plantas ou matéria animal utilizada para a produção, levando em conta o processo de produção, **os testes para:**

- Qualidade microbiológica,
- Metais pesados,
- Aflatoxinas, (ocratoxina A)
-Resíduos de pesticida

....nos extratos **pode ser necessário**.

MICOTOXINAS – Determinação

Determinação da Aflatoxina B1 em Drogas Vegetais (Ph. Eur. 2.8.18.)

Aflatoxina B1 é considerada a mais tóxica.

“Os medicamentos à base de plantas que estão sujeitos a contaminação pela aflatoxina B1 devem ser testados por um método validado.“

“O método descrito é citado como um exemplo de um método que se mostrou adequado para raiz de garra do diabo, gengibre e vagens de sene.

Sua adequação para outras drogas fitoterápicas (grupos de matrizes) deve ser demonstrada ou outro método validado pode ser usado . ”

MICOTOXINAS – Limites…..

General Limit of aflatoxin B1 in herbal drugs (Ph.Eur. 2.8.18.)

“Salvo indicação em contrário na monografia, os medicamentos fitoterápicos não devem contêm mais do que **2µg / kg de aflatoxina B1.** As autoridades também pode exigir conformidade com um limite de **4µg / kg para a soma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.** ”

(Porém, na Alemanha: "Aflatoxinverbotsverordnung" ou "Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln"; **se a aflatoxina B1> 2 µg / kg, o material é proibido/rejeitado e não pode ser processado!!!**

MICOTOXINAS – Determinação…

Determination of Ochratoxin in Herbal Drugs (Ph.Eur. 2.8.22.)

Descrição detalhada do método.

“As drogas à base de plantas que estão sujeitas à contaminação pela ocratoxina A devem ser testadas por um método validado.”

“O método descrito é citado como um exemplo de um método que se mostrou **adequado para o extrato de alcaçuz e raiz de alcaçuz.**

Sua adequação para outras drogas fitoterápicas (grupos de matrizes) deve ser demonstrada ou outro método validado poderá ser utilizado.

MICOTOXINAS – Limites…

Limites para a Ocratoxina A em monografias de Alcaçuz

Raiz de alcaçuz
Ocratoxina A (2.8.22): máximo de 20 µg por quilograma de medicamento à base de plantas.

Extrato líquido etanólico de alcaçuz, padronizado
Ocratoxina A (2.8.22): máximo 80 µg por quilograma de extrato.

Extrato seco de alcaçuz (água) para fins aromatizantes
Ocratoxina A (2.8.22): máximo 80 µg por quilograma de extrato (não diluído).

MICOTOXINAS – Implicações Práticas

- Métodos para determinação de aflatoxinas e ocratoxina A em drogas vegetais são descritos em Ph.Eur. e são adequados ao propósito.

- A validação de métodos por grupos matriciais e / ou matrizes específicas (por exemplo, resinas, óleos essenciais) tem que ser feita pelos próprios laboratórios.

- Limite fixo de aflatoxina B1, mas o limite da soma de aflatoxinas pode ser definido pelas autoridades nacionais. (por exemplo, gêneros alimentícios: Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão).

- O limite de ocratoxina A é dado apenas em monografias de alcaçuz. Ainda faltam limites para outros produtos (por exemplo, gêneros alimentícios: Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão).

MONITORAMENTO É NECESSÁRIO !!!!!

MICOTOXINAS – Implicações Práticas

Resíduos de micotoxinas em drogas fitoterápicas

Existem muitos dados de resíduos de aflatoxinas e ocratoxina A.

O conhecimento sobre a ocorrência de **outras micotoxinas em fitoterápicos é bastante restrito.**

Três espécies de fungo, em especial, formam micotoxinas, para as quais os níveis máximos foram estabelecidos pela Comissão Européia.

COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006

of 19 December 2006

setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs

MICOTOXINAS – Fungos.....

Microorganism	Mycotoxin
Aspergillus spec. (flavus)	Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1
Aspergillus spec. (ochraceus) Penicillium spec.	Ochratoxin A, Patulin
Fusarium spec.	Fumonisin, Zearalenone, Trichothecene (Deoxynivalenol, Nivalenol, T2-Toxin, HT2-Toxin)

MICOTOXINAS – Limites

Limits in commission regulation 1881/2006

COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006

of 19 December 2006

setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs

- Aflatoxins
- Ochratoxin A
- Patulin
- Deoxynivalenol
- Zearalenon
- Fumonisins
- T-2 and HT-2-Toxin

MICOTOXINAS – Determinação..

Testes de Rotina:

Aflatoxina B1, B2, G1, G2per HPLC (limite de detecção 50 ppt)
Aflatoxina M1per HPLC (limite de detecção 50 ppt)
Ocratoxina A por HPLC (limite de detecção 50 ppt)
Patulina por HPLC (limite de detecção 50 ppt)

Programa de triagem:

Zearalenona por HPLC
Deoxinivalenol, Nivalenol e T2-, HT2-Toxina por LC-MS / MS
Fumonisina B1 e B2 por HPLC

MICOTOXINAS – Determinação..

Análises de Aflatoxina B1 em 7250 amostras

Produtos com resultados positivos em muitos casos (> 2µg / kg):

- Fruta de agnus castus, fruta pimenta caiena, açafrão, raiz garra diabo, figos, gengibre, noz moscada, semente de nux vomica, semente de abóbora, fruto de senna .

Produtos com resultados esporádicos positivos:

- Erva-doce, (amargo) cascas de laranja, visco, raiz de alcaçuz, raiz de valeriana, raiz de açafrão, raiz de Alteia.

MICOTOXINAS – Determinação..

Análise de Patulina de 278 amostras:
2 produtos com resultados positivos: maçãs, cascas de laranja

Análise de Zearalenona de 125 amostras:
produtos com resultados positivos esporádicos (<100µg / kg): urtiga, rosa mosqueta, hortelã-pimenta, camomila, erva-doce, sálvia, melissa, verbena.

MICOTOXINAS – Determinação..

Análise de fumonisina de 155 amostras:
- produtos com resultados positivos esporádicos: cardamomo, raiz de alcaçuz, cascas de laranja, rosa mosqueta
(todos os resultados abaixo de 200 µg / kg, raiz de alcaçuz abaixo de 2000 µg / kg)

Análise DON de 69 amostras:
- 2 produtos com resultados positivos (<1000µg / kg): flores de tília, chá

MICOTOXINAS – Determinação..

Análise de Nivalenol de 48 amostras:
1 resultado positivo: flores de tília prateadas (47µg / kg)

Análise de toxina T2 e HT2-toxina de 48 amostras:
produtos com resultados positivos (<50µg / kg): frutos de anis, flores de tília, aveia, sálvia

MICOTOXINAS – Gerenciamento de Risco ..

- Apenas poucos medicamentos estão contaminados; um controle de qualidade de 100% de todos os lotes é necessário apenas para os produtos / fontes consideradas críticas
- Análise alvo de aflatoxinas e ocratoxina A (com base na avaliação de risco)
- As micotoxinas são bem solúveis em solventes alcoólicos: as análises dos extratos devem ser realizadas se existe possibilidade/suspeita de contaminação da matéria-prima..
- além de ocratoxina A e aflatoxinas, outras micotoxinas podem ser consideradas como alvo **caso a caso**!

- **desenvolver estratégias para evitar a contaminação na fonte (por exemplo, durante a secagem, armazenamento), implementar as BPA!**

MICOTOXINAS – Gerenciamento de Risco ..

Efeito da melhoria das BPA nos níveis de Ocratoxina A na raiz de alcaçuz (ppb):

Year	n	Maximum value analysed	90th Percentil
1999	50	425	234
2000	159	904	145
2001	192	337	41
2002	152	423	34
2003	60	72	20
2010	257	117	26
2011	82	65	19

PESTICIDAS

- Monografias gerais
- Pesticidas 2.8.13 Ph. Eur.
- Limites e cálculo
- EC 396/2005
- Base de dados de pesticidas da UE
- Lista de alocação EHIA
- Escopo do teste

PESTICIDAS - INTRODUÇÃO

- Das cerca de 400 plantas e partes de plantas existentes no mercado, somente 30 a 40 plantas são cultivadas em larga escala, ou seja, **a grande maioria das espécies de plantas (70-80%), são colhidas na natureza.**

- Portanto, é importante, ao abordar o problema da análise de resíduos de pesticidas em medicamentos à base de plantas, levar em conta a diversidade das diferentes matrizes, bem como as circunstâncias específicas nos países de origem.

PESTICIDAS – MONOGRAFIAS GERAIS

HERBAL DRUGS:

TESTES ...

Pesticidas (2.8.13) . As drogas vegetais devem cumprir com as exigências para resíduos de pesticidas.

As exigências levam em conta a natureza da planta, onde necessário a preparação na qual a planta pode ser usada e, quando disponível, o conhecimento do registro completo de produção e tratamento do lote da planta.

PESTICIDAS – MONOGRAFIAS GERAIS

EXTRATOS:
TESTES.....

Quando aplicável, como resultado da análise do medicamento à base de plantas utilizada para a produção do mesmo e tendo em vista o processo de produção, testes de qualidade microbiológica, metais pesados, aflatoxinas e resíduos de pesticidas nos extratos podem ser necessários.

PESTICIDAS – MONOGRAFIAS GERAIS

Droga Vegetais para Preparações Homeopáticas

TESTES…

Pesticidas (2.8.13) . Drogas vegetais para preparações homeopáticas **devem cumprir com os requisitos para resíduos de pesticida.**

…

Quando justificado, o teste para pesticidas pode ser realizada na tintura-mãe, de acordo com os requisitos da monografia para tinturas mãe para preparações homeopáticas (2029).

PESTICIDAS – MONOGRAFIAS GERAIS

Tinturas Mãe para Preparações Homeopáticas

Pesticidas (2.8.13). Onde aplicável, a tintura-mãe para preparações homeopáticas deve estar em conformidade com o teste. **Este requisito é considerado cumprido se a droga vegetal cumpriu com o teste.**

Justificativa é fornecida nos casos em que o teste para pesticidas é realizado na tintura mãe, ao invés de na droga vegetal de acordo com as exigências da monografia geral para drogas vegetais para preparações homeopáticas (2045).

PESTICIDAS – MONOGRAFIAS GERAIS

Resíduos de Pesticidas 2.8.13

- A monografia dos resíduos de pesticidas 2.8.13 foi introduzida na Ph.Eur. 1997 (USP 24 <561>, 2000).

- Em junho de 2006 o grupo de especialistas em pesticidas da Ph.Eur. foi encarregado de atualizar a monografia *Ph.Eur 2.8.13* referente à publicação *"Substâncias pesticidas em medicamentos e suas preparações" (PHARM EUROPA Vol.17 No. 1, janeiro de 2005).*

- Limites máximos para pesticidas frequentemente encontrados, **baseados em achados positivos** (percentis 90) foram estabelecidos e limites de quantificação foram propostos.

PESTICIDE RESIDUES IN MEDICINAL DRUGS AND THEIR PREPARATIONS

Lothar Kabelitz[1]*

ABSTRACT

Regulations for pesticide residues in herbal medicinal drugs are included in the Monograph "Pesticide Residues" of the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). According to the monograph limits applying to pesticides not listed in the table of the monograph comply with the limits set by the EC directives 76/895 and 90/642 including their annexes and successive updates. The limits indicated in the mentioned EC directives that have been adopted in German legislation within the Maximum Residue Level Regulation (Rückstands-Höchstmengenverordnung, RHmV) are not appropriate. They refer to certain product groups only, they are generally too low and therefore they are not practicable.

According to the Contaminants Working Group of the Federal Association of Pharmaceutical Product Manufacturers (BAH) 67 pesticides respectively substance groups are relevant to a selection of 205 herbal medicinal drugs which were given a positive assessment by the E Commission or ESCOP or a monograph by the Ph. Eur.

Product Manufacturers (BAH) in Germany, comprising members of the scientific staff of Martin Bauer GmbH & Co KG, Finzelberg GmbH & Co KG, Emil Flachsmann AG, Gehrlicher GmbH & Co KG, Chemische Fabrik Dr. Hetterich KG, Kneipp Werke GmbH & Co KG, PhytoLab GmbH & Co KG and Salus-Haus GmbH & Co KG, collated extensive information and data concerning more than 200 pesticides and in excess of 400 drugs for the period between 1st January 1998 and 31st December 2002.

PESTICIDAS – Definição 2.8.13

Definition. For the purposes of the Pharmacopoeia, a pesticide is any substance or mixture of substances intended for preventing, destroying or controlling any pest, unwanted species of plants or animals causing harm during or otherwise interfering with the production, processing, storage, transport or marketing of herbal drugs. The item includes substances intended for use as growth-regulators, defoliants or desiccants and any substance applied to crops, either before or after harvest, to protect the commodity from deterioration during storage and transport. Pesticide residues can be present and are controlled in herbal drugs and herbal drug preparations.

PESTICIDAS – Tipos….

Herbicidas - plantas (Algicidas, Graminicidas, Arboricidas)
Fungicodas - fungos e fungos
Inseticidas- insetos
Acaricidas - ácaros
Moluscicidas - lesmas e caracóis
Nematicidas - nematoides
Rodenticidas - roedores
Avicidas - pássaros

PESTICIDAS – Limites….

Limits. Unless otherwise indicated in the monograph, the herbal drug to be examined at least complies with the limits indicated in Table 2.8.13.-1. The limits applying to pesticides that are not listed in Table 2.8.13.-1 and whose presence is suspected for any reason comply with the limits (levels) cross referred to by Regulation (EC) No. 396/2005, including annexes and successive updates. Limits for pesticides that are not listed in Table 2.8.13.-1 nor in European Union texts are calculated using the following expression:

PESTICIDAS

Pesticide Residues 2.8.13 - Calculation

$$\frac{ADI \times M}{MDD_{HD} \times 100}$$

ADI	=	acceptable daily intake, as published by FAO-WHO, in milligrams per kilogram of body mass;
M	=	body mass in kilograms (60 kg);
MDD_{HD}	=	daily dose of the herbal drug, in kilograms.

PESTICIDAS

Pesticide Residues 2.8.13 – Calculation in Extracts

The limits for pesticides in herbal drug preparations are calculated using the following expressions:

If DER ≤ 10: $$MRL_{HD} \times DER$$

If DER > 10: $$\frac{ADI \times M}{MDD_{HP} \times 100}$$

MRL_{HD} = maximum residue limit of the pesticide in the herbal drug as given in Table 2.8.13.-1 or in EU texts or calculated using the expression mentioned above;

DER = drug/extract ratio, i.e. the ratio between the quantity of herbal drug used in the manufacture of a herbal drug preparation and the quantity of herbal drug preparation obtained;

MDD_{HP} = daily dose of the herbal drug preparation, in kilograms.

PESTICIDAS – Posso não analisar??

Pesticide Residues 2.8.13 – Exemption

The competent authority may grant total or partial exemption from the test when the complete history (nature and quantity of the pesticides used, date of each treatment during cultivation and after the harvest) of the treatment of the batch is known and can be checked precisely according to good agricultural and collection practice (GACP).

GERENCIAMENTO DE RISCOS

Pesticide Residues 2.8.13 – Method requirements

Qualitative and quantitative analysis of pesticide residues. The analytical procedures used are validated (e.g. according to Document N° SANCO/10232/2006). In particular, they satisfy the following criteria:

- the chosen method, especially the purification steps, is suitable for the combination pesticide residue/substance to be examined, and not susceptible to interference from co-extractives;
- natural occurrence of some constituents is considered in the interpretation of results (e.g. disulfide from Cruciferaceae);

PESTICIDAS

Resíduos de pesticidas 2.8.13 (resumo)

- Expandir número de substâncias na tabela 2.8.13-1 a 115 pesticidas (70 MRL`s)
- Referência cruzada para a nova lei alimentar europeia
- Fórmula para cálculo de resíduos em preparações de drogas à base de plantas
- Amostragem de acordo com Ph.Eur. 2.8.20.
- O método para determinação de pesticidas foi eliminado
- Método de validação acc. para SANCO / 10232/2006 (atualizado SANCO / 10684/2009)
- Considerando constituintes naturais durante a interpretação dos resultados (por exemplo, dissulfeto)

PESTICIDAS - Vantagens na prática

- Nenhum método fixo em Ph.Eur. (diferentes métodos são usados em laboratórios de resíduos de pesticidas dependendo das substâncias e instrumentos).

- Procedimentos de validação harmonizados para os métodos utilizados: **Validação de métodos e procedimentos de controle de qualidade para análises de resíduos de pesticidas em alimentos para consumo humano e animal: SANCO / 10684/2009 (atualização).**

- Lista de pesticidas **frequentemente encontrados** expandida (34 a 115 substâncias).

- Referência aos limites máximos de resíduos (LMR) harmonizados para géneros alimentícios e alimentos para animais na Europa: Regulamento (CE) n.º 396/2005 da Comissão.

PESTICIDAS

Resíduos de pesticidas 2.8.13.

- Quais Limites Máximos de Resíduos (MRLs) estão sendo aplicados a pesticidas que não estão listados no Ph.Eur. Tabela 2.8.13.-1?

Regulamento (CE) n.º 396/2005 da Comissão, incluindo anexos e sucessivas atualizações

- Para os pesticidas não listados nos textos da União Europeia aplica-se o LMR de 0,01 mg / kg.

- Cálculo com valor ADI é possível (FAO / WHO).

* **ADI: A ingestão diária admissível é definida como a quantidade máxima de um produto químico que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida, sem risco apreciável para a saúde, e baseia-se na maior ingestão que não dá origem a efeitos adversos observáveis**.

PESTICIDAS

Estabelecimento de LMRs de pesticidas

- Os LMR para pesticidas são derivados de ensaios de campo conduzidos no âmbito do BPA.
- Ao mesmo tempo, estudos toxicológicos in vitro / in vivo são realizados para estabelecer valores de ADI e ARfD
- Resultados de ensaios de campo + cálculo de potencial de entrada são apenas usado se não excederem ADI / ARfD
- Níveis residuais > LMR devem ser analisados caso a caso para determinar se a ingestão excederia os limites seguros.
- O produto é rejeitado somente se RL > ARfD

**ARfD (dose aguda de referência)*
O ARfD é derivado de maneira análoga à ADI, mas com atenção aos efeitos de curto prazo.

Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI)†

Andrew G Renwick*
Clinical Pharmacology Group, University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Bassett Crescent East, Southampton SO16 7PX, UK

PESTICIDAS

Regulamento (CE) n.º 396/2005

No contexto deste regulamento, foram fixados LMR (145.000) para todos os pesticidas em cada um dos produtos enumerados no anexo I (315). Diversas drogas herbáceas podem ser potencialmente alocadas em diferentes categorias, dependendo do seu uso:

e.g. peppermint	→	fresh herb
	(→	herbal infusion ?)
e.g. fennel	→	spices
	(→	herbal infusion ?)

Mas apenas um único LMR para um produto é permitido.

PESTICIDAS

Allocation of products (396/2005 Annex I)

1. FRUIT FRESH OR FROZEN

(d) Other small fruit & berries
Blueberries (Bilberries cowberries (red bilberries))
Cranberries
Currants (red, black and white)
Gooseberries (Including hybrids with other ribes species)
Rose hips

2. VEGETABLES FRESH OR FROZEN

(f) Herbs
Chervil
Parsley
Sage (Winter savory, summer savory,)
Rosemary
Thyme (marjoram, oregano)

Allocation of products (396/2005, Annex I)

6. TEA, COFFEE, HERBAL INFUSIONS, COCOA

(iii) Herbal infusions (dried)
(a) Flowers
Camomille flowers Hybiscus flowers Others
(b) Leaves
(c) Roots
(d) Other herbal infusions

8. HOPS

9. SUGAR PLANTS

Sugar beet (root)
Sugar cane
Chicory roots
Others

7. SPICES

PESTICIDAS

Lista de alocação de EHIA

- Existem 315 produtos listados no Anexo I do Regulamento 396/2005, mas nem todas as plantas atualmente em circulação no mercado estão listados.

- Em muitas categorias, a subcategoria “outros“ é adicionada. A alocação de produtos que não estão listados no Anexo I (por exemplo, urtiga, St. Johns wort) é uma dificuldadea ser administrada.

- **A European Herbal Infusion Association (EHIA)** publicou uma lista de distribuição para cerca de 400 plantas e partes de plantas. Com base na lista de inventário da EHIA, todos os 400 produtos estão alocados nas **categorias do Anexo I, considerando também o uso principal do produto.**

Update: January 2013

EHIA INVENTORY LIST OF HERBALS CONSIDERED AS FOOD						Allocation according to Reg. (EU) No 600/2010			
	English		Latin	German		Allocation			
	Name of the plant	Plant part used	Name of the plant	Name of the plant	Plant part used	Category	Group	Subgroup	Code number
*	Agrimony	herb	*Agrimonia eupatoria* L.	Odermennig	Kraut	tea, coffee, herbal infusions and cocoa	herbal infusions	other herbal infusions	639000
	Alfalfa / Luzerne	herb	*Medicago sativa* L.	Alfalfa / Luzerne	Kraut	tea, coffee, herbal infusions and cocoa	herbal infusions	other herbal infusions	639000
	Allspice	fruits	*Pimenta dioica* (L.) Merr. / *Pimenta officinalis* Lindl.	Piment	Früchte	spices	spices	allspice	820010
	Almond	flowers	*Prunus dulcis* var. *dulcis*	Mandel	Blüten	tea, coffee, herbal infusions and cocoa	herbal infusions	flowers, others	631990
	Almond	seeds	*Prunus dulcis* var. *dulcis*	Mandel	Samen	fruit fresh and frozen, nuts	nuts	almonds	120010
*	Aloe vera	leaf gel	*Aloe barbadensis* Mill. / *Aloe vera* (L.) Burm.f.	Aloe vera	Blattgel	tea, coffee, herbal infusions and cocoa	herbal infusions	other herbal infusions	639000
*	Alpine ladies mantle	herb	*Alchemilla alpina* L.	Silbermantel	Kraut	tea, coffee, herbal infusions and cocoa	herbal infusions	other herbal infusions	639000
*	Angelica	roots	*Angelica archangelica* L.	Engelwurz	Wurzeln	vegetables fresh or frozen	root and tuber vegetables	other root and tuber vegetables except sugar beet	213040
*	Angelica	stems	*Angelica archangelica* L.	Engelwurz	Stengel	vegetables fresh or frozen	leaf, vegetables and fresh herbs	celery leaves	256030
	Anise	fruits	*Pimpinella anisum* L.	Anis	Früchte	spices	spices	anis	810010
	Annato	seeds	*Bixa orellana* L.	Annatto	Samen	spices	spices	seeds, others	810990

PESTICIDAS

Aspectos regulatórios

As diferentes alocações de fitoterápicos estão causando MRLs diferentes em muitos casos. Por exemplo:

Herbal drugs	Acetamiprid MRL	Endosulfan MRL
Orange peels	5 mg/kg (DF 5)	0,25 mg/kg (DF 5)
Rosehips	0,05 mg/kg (DF 5)	0,25 mg/kg (DF 5)
Peppermint	15 mg/kg (DF 5)	0,25 mg/kg (DF 5)
Chamomille	0,1 mg/kg	0,5 mg/kg
Fennel	0,1 mg/kg	1 mg/kg
Liquorice	0,1 mg/kg	0,5 mg/kg
Tea	0,1 mg/kg	30 mg/kg
Organic products	0,01 mg/kg	0,01 mg/kg

Isto tem que ser considerado no desenvolvimento de um método de análise.

Escopo dos Testes

Na Ph.Eur. 2.8.13. um teste reduzido é permitido se a droga vegetal tiver sido cultivada de acordo com boas práticas agrícolas e de coleta (GACP).

Para todas as outras drogas vegetais, a seguinte recomendação sobre análise de pesticidas pode ser dada:

1. Análise de pesticidas frequentemente encontrados (multi métodos)

2. Análise de pesticidas cuja presença é suspeita por qualquer motivo (métodos específicos e métodos únicos)

PESTICIDAS

Desenvolvimento de métodos para testes de pesticidas

Existem 550 compostos e metabolitos listados na EU 396/2005, mas existem cerca de 1.650 pesticidas químicos (Pesticide Manual 2003).

Nos laboratórios analíticos, 400-600 analitos pudem ser detectados através de:

- → multi methods
- → group specific methods
- → single residue methods

Existe uma lacuna analítica de mais de 1000 substâncias.

Development of methods for pesticide testing

Multi methods:

GC-methods (e.g. DFG S19) →about 200-300 substances

LC-MS/MS (e.g. Quechers) →about 200-300 substances

Group specific methods:

Dithiocarbamates,Phenoxyalkancarbonic acids, Phenylureas, Carbamates, … →about 60 substances

Single methods:

Pyridat, Chlormequat, Glyphosate, Paraquat, Nicotine … →about 20 substances

PESTICIDAS

Visão geral do Método

- Multi-métodos permitiriam a análise de pesticidas que são encontrados frequentemente em drogas vegetais e extratos
- O multi-método clássico por GC pode detectar substâncias da Ph. Eur. tabela 2.8.13 - (exceto ditiocarbamatos) e um amplo espectro de cloro e fósforo.
- Com o método LC-MS / MS-multi, pesticidas modernos e polares como Carbendazim, 2,4-D, Neo-Nicotinoids e outros) são detectados.
- Com os métodos de grupo e único, os compostos que não são detectáveis com os multi métodos podem ser analisados.

PESTICIDAS

Influência da Concentração e de Compostos Naturais

- Drogas vegetais sofreram processo de secagem para conservação e, normalmente, o conteúdo restante de água é inferior a 12%.

- Por essa razão, o processamento causa uma concentração de resíduos de pesticidas com **um fator de aproximadamente 5.**

- **Da mesma forma, substâncias químicas na planta são concentradas** causando dois efeitos na análise de pesticidas:

➢ **Por um lado, os efeitos das matrizes também enriquecem e influenciam os métodos analíticos;**
➢ **Por outro lado, a ocorrência genuína de algumas substâncias na planta leva a resultados falso-positivos em alguns casos.**

Requisitos para a Análise de Pesticidas

• A calibração matricial (ou padrão de referência interno, rotulado como isótopo) é frequentemente é necessária

• na LC-MS / MS, na maioria das vezes, a supressão de pico é observada:

- em calibração da matriz de LC-MS / MS é altamente recomendada
- em supressão de sinal GC-MS-MS ou aumento é possível

• A verificação de resultados positivos pode ser obtida por adição padrão; ainda assim, resultados falso-positivos devido a componentes matriciais são possíveis (íons de produto idênticos, tempos de retenção idênticos)

- Verificação através de ajustes das condições cromatográficas
- Utilização de HR-MS

Requisitos para um controlo eficaz dos pesticidas nos produtos à base de plantas:

- Informações detalhadas sobre os requisitos legais

- Experiência e conhecimento de quais pesticidas são usados para quais plantas e em qual país respectivamente

- Experiência e conhecimento sobre riscos de contaminação (banco de dados)

- Escolha do (s) método (s) de teste mais adequado

- Monitoramento e análise de alvos da droga vegetal

Pesticidas - Avaliação de Risco

- **Alta sensibilidade na população**

- **Não é possível garantir produtos sem resíduos de pesticidas**

- **No controle de qualidade, nem todos os pesticidas podem ser testados a cada vez, devido ao número de substâncias (gap analítico) e ao número de métodos diferentes usados (análise baseada em risco).**

→ combination of detailed information about supply chain (e.g. controlled cultivation) and analytical control is necessary

Base para o Gerenciamento de Riscos de Contaminantes

- Screening de regulamentos existentes e publicações
- definição de possíveis contaminantes
- Desenvolvimento de métodos adequados de análise (ou busca de um laboratório adequado)
- Executar análises (monitorar produtos, realizar análises)
- Avaliação de resultados (banco de dados) e avaliação de risco
- Criar esquemas de testes baseados em risco (drogas vegetais normalmente são testadas)
- Melhorar a qualidade (BPAC, processamento)

References to Contaminants

•**European Pharmacopoeia** (monograph “Herbal Drugs“, pesticides, heavy metals, aflatoxins, ochratoxin A and microbiology).

•**EC regulations for foodstuffs** (e.g. pesticides, mycotoxins, heavy metals, PAHs, radioactivity, nitrates).

•**National regulations** (e.g. German aflatoxin regulations, German regulation for contaminants).

•**Publications** (e.g. Codex Alimentarius, Food and Agriculture Organization (FAO/UN);Compendium: „Worldwide regulations for mycotoxins 1995“; ***Current Findings on the Heavy Metal Content in Herbal Drugs***, *Pharmeuropa Scientific Notes 2009-1)*.

Laerte Dall´Agnol
laerte@dallsolucoes.com.br

Aline Rachel Cavagnoli Dall´Agnol Santin
aline@dallsolucoes.com.br

Gustavo Bertol
gustavo@dallsolucoes.com.br

www.dallsolucoes.com.br

OBRIGADA!

Fone:
55 41 3089-7376
55 41 3434-5266
55 41 99815-5353

Endereço:
Rua Holanda,
1560, Boa Vista
Curitiba PR
CEP 82540-040

DALL
Soluções Analíticas e Empresariais