

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
"ANÁLISE, SÍNTESE E CONTROLE DE MEDICAMENTOS"

DESENVOLVIMENTO GALÊNICO DE MACERADOS DE
Baccharis trimera (LESS.) DC. - COMPOSITAE - (CARQUEJA)

Dissertação apresentada por
JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO
para obtenção do Grau Acadê-
mico de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. PEDRO ROS PETROVICK

PORTO ALEGRE - 1989

Dissertação apresentada e aprovada em 17 de agosto de 1989, perante banca constituída dos professores:

Dr. Eloir Paulo Schenkel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Walter Vichnewski

Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto

Dr. Pedro Ros Petrovick - Orientador

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

M527d Mello, João Carlos Palazzo de

Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. - Compositae - (carqueja). - Porto Alegre : 1989. - 135p.

Dissertação (mestrado). Análise, Síntese e Controle de Medicamentos. UFRGS.

1. Tecnologia farmacêutica: fitoterápicos.

I. TÍTULO

CDU:615.4:615.322

Índices para catálogo:

Tecnologia Farmacêutica

Farmacognosia: Fitoterápicos

A

Meus pais, João e Jandyra

Minha Esposa, Eneri

Meus filhos, Jiulle Uana,

João Henrique e Carolina

Meus Sogros, Verandy e Irene

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Pedro Ros Petrovick, pela aceitação como orientando, pela orientação, pelo grande incentivo demonstrado durante o decorrer deste, pela introdução no ramo da ciência farmacêutica, deixando em aberto um caminho a trilhar muito maior do que se mostra neste momento, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. Eloir Paulo Schenkel pela ajuda, pela sinceridade, amizade e compreensão nas horas de dificuldades.

À mais que amiga e colega Diva Sonaglio, pelo incentivo e ajuda, para que pudéssemos concluir este trabalho.

À Professora Lilian Auler Mentz, pela grande ajuda prestada durante o início deste, além dos préstimos de seu vasto conhecimento botânico.

A Grace, Karla, Lauren, Luciana, Mara Lane, Nádia, Paulo Sander, Rosana e todos aqueles com quem convivi durante todo este tempo, pela amizade que permanece em nossa lembrança.

À Professora e colega Selma Lucy Franco, pela paciência nos momentos de dificuldades e pela colaboração no decorrer do trabalho.

Ao colega e grande amigo Edvani Curti Muniz, o meu sincero agradecimento pelo incentivo, ajuda e pela amizade

demonstrada ao longo destes anos de convivência.

Aos Professores Basílio Bacarin, Neumar Adélio Godoy e Mauro Alvarez pelo incentivo e ajuda na realização deste curso e trabalho.

À Professora Dr^a. Catarina T. Moreira Bacha pelo incentivo inicial na realização deste curso.

Àqueles que por qualquer motivo não tenha citado nominalmente, não esquecerei tão cedo, por tudo que tenham feito para que este trabalho fosse concluído.

À CAPES pela liberação de recursos financeiros para que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A determinação da qualidade de um medicamento envolve, além das diversas etapas de sua obtenção, a avaliação da matéria-prima e do produto acabado. Para um fitoterápico, cuidados especiais devem ser tomados com a matéria-prima vegetal, face a sua complexidade e variedade.

Desenvolveu-se uma preparação farmacêutica na forma de macerado hidroalcoólico das partes aéreas floridas de *Baccharis trimera* (Less.) DC., Compositae (carqueja).

A matéria-prima vegetal foi padronizada através da identificação botânica e de métodos físico-químicos, avaliando-se a composição química por técnicas cromatográficas (CP, CCD, CLV e CLAE). Eupatorina e 3-0-metilquercetina foram doseadas por dois métodos de quantificação através de cromatografia em camada delgada associada a espectrometria no ultravioleta (CCD/UV) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O flavonol 3-0-metilquercetina, até então não detectado no gênero *Baccharis*, foi isolado e identificado por CP, CCD, CLV, CLAE e por espectroscopia no ultravioleta. A influência dos fatores tecnológicos, tempo de maceração, teor de etanol no líquido extrativo e granulometria da droga, foi avaliada através de análise fatorial do tipo 2ⁿ. A quantificação por CLAE foi empregada também para a validação do método CCD/UV.

A análise fatorial demonstrou ser adequada a avaliação

da influência dos fatores tecnológicos a produção de formas farmacêuticas oriundas do vegetal em estudo em face a obtenção de um maior rendimento em flavonóides.

Nessa análise observou-se que o rendimento de eupatorina depende somente da granulometria da droga e que o aumento da concentração etanólica e da granulometria reduz a concentração de 3-0-metilquercetina. O prolongamento do tempo de maceração resulta numa maior quantidade deste flavonóide.

ABSTRACT

The quality determination of drugs implicates in the evaluation of the raw material, process and final product. Some special care must be taken in the preparation of phytotherapeutic drugs in order to assure the quality of the plant material, due to its complexity and variety.

A hydroalcoholic macerate from flowery aerial parts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., Compositae ('carqueja') was developed regarding the aspects of its total quality and galenical development.

The plant raw material was standardized through botanical and physico-chemical methods. The chemical composition of the raw material, intermediate products and extract was evaluated through chromatographic (PC, TLC, VLC and HPLC) and physic techniques. For the quantitation of the tracer substances, eupatorin and 3-O-methylquercetin, were used two methods: thin-layer chromatography associated with UV spectrophotometry (TLC/UV) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC was used for the validation of the TLC/UV-method.

The presence of 3-O-methylquercetin, a new substance for the genus *Baccharis*, was determine by chromatographic and UV-spectroscopic methods.

The influence of some technological factors such as

maceration time, ethanol concentration in the extraction liquid and granulometry of the plant material was analysed using 2^n factorial design.

The factorial analysis demonstrated to be suitable to evaluate this influence considering the yield of flavonoids.

While the yield of eupatorin depends only on the granulometric range of the plant material, increase of ethanolic concentration and granulometry reduces the concentration of 3-O-methylquercetin. Prolongation of maceration time results on a higher amount of this flavonoid.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 MATERIAL	
2.1.1 Matéria-Prima Vegetal	12
2.1.2 Aparelhos e Equipamentos	12
2.1.3 Reagentes, Soluções, Substâncias Rea- gentes e Referências	14
2.1.4 Material para Cromatografia	
2.1.4.1 Adsorventes	15
2.1.4.2 Equipamentos	15
2.1.4.3 Detecção das manchas cromatográficas	15
2.1.4.4 Solventes	16
2.2 METODOLOGIA	
2.2.1 Caracterização Botânica	16
2.2.2 Determinação do Índice de Amargor	17
2.2.2.1 Preparação da solução referência de brucina	17
2.2.2.2 Preparação das soluções de decocto e extrato turbolizado	17
2.2.2.2.1 Preparação das diluições do decocto (DE)	17

2.2.2.2.2	Preparação das diluições do extrato turbolizado (ET)	18
2.2.2.3	Verificação do índice de Amargor (IA)	18
2.2.3	Determinação do Índice de Espuma	19
2.2.3.1	Para o decocto (DE)	19
2.2.3.2	Para o extrato turbolizado (ET) ...	19
2.2.4	Determinação do pH	20
2.2.5	Determinação da Perda por Dessecação	20
2.2.6	Determinação do Resíduo Seco	21
2.2.7	Determinação do Teor Alcoólico	21
2.2.7.1	Para o extrato turbolizado (ET) ...	21
2.2.7.2	Para os macerados (MC)	22
2.2.8	Determinação do Teor de Extrativo	22
2.2.9	Determinação do Teor de Flavonóides Totais	23
2.2.10	Determinação do Teor de Óleo Essencial	24
2.2.11	Teste de Saponinas	25
2.2.12	Análise Granulométrica (AG)	25
2.2.13	Análise Cromatográfica (AC)	26
2.2.13.1	Cromatografia em papel (CP)	27
2.2.13.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	27
2.2.13.3	Cromatografia líquida a vácuo (CLV)	30
2.2.13.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
2.2.14	Determinação do Flavonol 3-0-metilquercetina (Substância T)	34
2.2.15	Métodos de Extração	35
2.2.15.1	Decocção (DE)	35
2.2.15.2	Maceração (MC)	35
2.2.15.3	Turbolização (ET)	36
2.2.16	Purificação dos Extratos	36
2.2.17	Análise Quantitativa	38
2.2.17.1	Preparo das soluções padrão	38
2.2.17.1.1	3-0-metilquercetina (3MQ)	38

2.2.17.1.2	Eupatorina (EUP)	39
2.2.17.2	Método CCD/UV	39
2.2.17.3	Método CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).....	41
2.2.18	Análise Fatorial	
2.2.18.1	Projeto fatorial	42
2.2.18.2	Avaliação do projeto fatorial	43
2.2.18.3	Análise da variância do pro- jeto fatorial	45
2.2.19	Cálculos Estatísticos	48
3.	RESULTADOS	
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	
3.1.1	Análise Botânica	51
3.1.2	Perda por Dessecação	52
3.1.3	Perda por Secagem	52
3.1.4	Teor de Extrativo	52
3.1.5	Teor de Flavonóides Totais	53
3.1.6	Teor de Óleo Essencial	53
3.1.7	Teste de Saponinas	53
3.1.8	Análise Granulométrica (AG)	54
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO DECOCTO (DE) E DO EXTRATO TURBOLIZADO (ET)	
3.2.1	Determinação do Índice de Amargor (IA)	54
3.2.2	Determinação do Índice de Espuma (IE)	55
3.2.3	Valor do pH	55
3.2.4	Determinação do Resíduo Seco	55
3.2.5	Determinação do Teor Alcoólico para o Extrato Turbolizado (ET)	56
3.2.5.1	Pelo método do picnômetro	56
3.2.5.2	Pelo método do areômetro	56
3.2.6	Análise Cromatográfica (AC)	56
3.2.6.1	Decocto (DE)	57
3.2.6.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) do decocto purificado (DEP)	57
3.2.6.1.2	Cromatografia lí- quida de alta efi- ciência (CLAE) do	

	decocto purificado	
	(DEP)	58
3.2.6.2	Extrato turbolizado (ET)	59
3.2.6.2.1	Cromatografia em papel (CP)	60
3.2.6.2.2	Cromatografia em ca- mada delgada (CCD)	61
3.2.6.2.3	Cromatografia líquida a vácuo (CLV)	62
3.2.6.2.4	Cromatografia líquida de alta eficiên- cia (CLAE)	63
3.3	DETERMINAÇÃO DA SUBSTÂNCIA T	
3.3.1	Espectroscopia no Ultravioleta (UV)	64
3.3.2	Cromatografia em Papel (CP)	67
3.3.3	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	68
3.3.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiên- cia (CLAE)	71
3.4	ANÁLISE QUANTITATIVA	
3.4.1	Estudo do Comportamento Espectroscópico no UV das Substâncias Referência 3-0-me- tilquercetina (3MQ) e Eupatorina (EUP)	73
3.4.2	Método CCD/UV	
3.4.2.1	Para 3-0-metilquercetina (3MQ) ...	75
3.4.2.2	Para eupatorina (EUP)	75
3.4.3	Método CLAE	
3.4.3.1	Para 3-0-metilquercetina (3MQ) ...	76
3.4.3.2	Para eupatorina (EUP)	77
3.5	ANÁLISE FATORIAL DOS MACERADOS (MC)	
3.5.1	Cálculos para Análise da Variância	82
3.5.1.1	Teste Fisher (Teste F)	83
3.5.1.1.1	Para 3-0-metilquer- cetina (3MQ)	83
3.5.1.1.2	Para eupatorina (EUP) .	84
3.5.1.2	Método de Yates	84
3.5.1.3	Método de Tukey (método T)	85
4.	DISCUSSÃO	88
5.	CONCLUSÕES	122
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	- Esquema de eluição para a cromatografia líquida a vácuo (CLV)	31
2	- Combinações dos fatores para realização dos experimentos	43
3	- Forma padrão para avaliação dos efeitos principais e interações em um projeto fatorial 2^3 ...	46
4	- Método de YATES para os cálculos dos efeitos principais e suas interações	47
5	- Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em função do tempo de armazenamento	52
6	- Perda por secagem da matéria-prima vegetal.....	52
7	- Percentagem de óleo essencial da matéria-prima vegetal em relação ao tempo de armazenamento	53
8	- Análise granulométrica por tamisação de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. rasurada.....	54
9	- Títulos das diluições de brucina, turbolizado (ET) e decocto (DE) (V/V) e respectivos índices de amargor (IA) para os extratos	54
10	- Índice de espuma (IE) para o decocto (DE) e turbolizado (ET) (n = 3)	55

Tabelas	Página
11 - Valores de pH para os extratos decocto (DE), turbolizado (ET) e para os solventes (n=3)	55
12 - Resíduo seco para o decocto (DE) e extrato turbolizado (ET) (n=3) calculado a partir da equação (3) (2.2.8)	55
13 - Tempo de retenção (TR), largura da base (W), área sob a curva (A) e fator de resolução (Ri) entre os picos 5 e 6 do DEP	58
14 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W), fator de resolução (Ri) e área dos picos (A) do extrato turbolizado (ET) e das substâncias referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) analisadas por CLAE em relação à quercetina (Q)	64
15 - Comparação no comportamento espectroscópico no UV da substância T e da 3-0-metilquercetina	64
16 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W), fator de resolução (Ri) e área dos picos (A) dos macerados purificados e das substâncias referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) em relação à quercetina (Q)	72
17 - Valores de absorção da solução metanólica padrão de 3-0-metilquercetina (3MQ), determinados diretamente e após separação cromatográfica (CCD/UV), a 358nm	75
18 - Valores de absorção da solução metanólica padrão de eupatorina (EUP), determinados diretamente e após separação cromatográfica (CCD/UV), a 342nm	75
19 - Concentração de 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos extratos turbolizado (ET) e turbolizado purificado (ETP) pelo método CCD/UV segundo a equação (6) (2.2.17.2)	76

Tabela	Página
20 - Área dos picos da substância referência 3-0-metilquercetina (3MQ) para a curva padrão por CLAE ..	76
21 - Área dos picos da substância referência eupatorina (EUP) obtida por CLAE	77
22 - Concentração de 3-0-metilquercetina padrão (3MQp) no extrato turbolizado purificado (3MQe), de eupatorina padrão (EUPp) e no extrato turbolizado purificado (EUPe) segundo a equação (7) (2.2.17.3)	77
23 - Valor do pH dos líquidos extratores e dos macerados (MC) à temperatura ambiente pela média de três determinações	78
24 - Teor alcoólico dos macerados (MC) a 15°C e a 20°C determinado respectivamente, por areômetro (A) e por alcoômetro de Gay-Lussac (B) (n = 3)	79
25 - Resíduo seco total (RST) para os macerados (MC) (n = 9)	79
26 - Resíduo seco purificado (RSP) para os macerados (MC) (n = 3)	80
27 - Concentração de 3-0-metilquercetina (3MQ) para os macerados purificados (MCP) utilizando-se da equação (7) (2.2.17.3)	80
28 - Concentração de eupatorina (EUP) para os macerados purificados (MCP) utilizando-se da equação (7) (2.2.17.3)	81
29 - Efeitos e interações (E/I) calculados a partir da forma padrão sobre o pH, teor alcoólico (TA), resíduo seco total (RST), resíduo seco purificado (RSP) e concentração de 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos extratos macerados	81

Tabela	Página
30 - Áreas dos picos das substâncias 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) dos macerados purificados (MCP) por CLAE para análise da variância (AV)	82
31 - Dados do teste F para 3-0-metilquercetina obtidos por CLAE dos macerados purificados	83
32 - Dados do teste F para eupatorina obtidos por CLAE dos macerados purificados	84
33 - Valores estimados ($\hat{\Psi}$) para as áreas dos picos nos tratamentos das substâncias 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP)	85
34 - Valores de Ψ do método de TUKEY (método T) através da equação (17) para as áreas de 3-0-metilquercetina obtidas por CLAE	86
35 - Valores de Ψ do método de TUKEY (método T) através da equação (18) para as áreas de eupatorina obtidas por CLAE	87
36 - Intensidade relativa percentual de eupatorina (EUP) no UV	106
37 - Intensidade relativa percentual de 3-0-metilquercetina (3MQ) no UV	106

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Flavonóides isolados e identificados em <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	5
2 - Aparelho de laboratório para cromatografia líquida a vácuo (CLV)	32
3 - Esquema de extração e purificação dos extratos	37
4 - Programa para cálculo dos coeficientes de regressão linear simples, correlação linear de Pearson (r) e teste 't' para r (programa A) e cálculo do valor de 't' referente ao teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (programa B)	50
5 - Cromatografia em camada delgada do decocto purificado (DEP) e de 3-O-metilquercetina (3MQ) utilizando o sistema eluente I-8 do item 2.2.13.2	57
6 - Cromatograma (CLAE) do decocto purificado (DEP) (volume inicial de 40ml) nas condições pré-estabelecidas em 2.2.13.4 (fase móvel: metanol: ácido fosfórico a 1% (V/V) (40: 60; V/V); fluxo: 2,0ml/minuto; detecção: 342nm)	58

Figura	Página
7 - Cromatogramas do extrato turbolizado (ET), turbolizado purificado (ETP) e das substâncias referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP)	59
8 - Cromatogramas em papel do extrato turbolizado (ET), extrato turbolizado purificado (ETP), 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos sistemas a-2 e a-3 descritos no item 2.2.13.1	60
9 - Cromatogramas do extrato turbolizado (ET) nos sistemas cromatográficos descritos em 2.2.13.2	61
10 - Cromatograma das frações do extrato turbolizado (ET) obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizando o sistema cromatográfico I-9 (2.2.13.2)	62
11 - CLAE do extrato turbolizado purificado (1), da 3-0-metilquercetina (2), eupatorina (3) e quercetina (4)	63
12 - Espectro no UV da substância T (ST) em solução metanólica e espectros com adição de reativos de ionização e/ou quelação. (1) H_3COH ; (3) $H_3COH + H_3CONa$; (4) $H_3COH + AlCl_3$; (5) $H_3COH + AlCl_3 + HCl$; (6) $H_3COH + CH_3CH_2ONa$; (7) $H_3COH + CH_3CH_2ONa + H_3BO_3$ e da 3-0-metilquercetina padrão (2)	65
13 - Espectroscopia no UV da substância T (1), 3-0-metilquercetina padrão (2) e da sua mistura (3)	66
14 - Cocromatografia em papel da substância T (ST) com 3-0-metilquercetina (3MQ) nos sistemas cromatográficos do item 2.2.13.1	67

- 15 - Cromatogramas de camada delgada em diversos sistemas (I-6; I-10; I-11; I-12; II-1 e II-2), da substância T (ST), 3-0-metilquercetina (3MQ) e da mistura das substâncias (ST + 3MQ) 68
- 16 - Cromatografia bidimensional da substância T (ST), 3-0-metilquercetina (3MQ) e da mistura ST + 3MQ nos sistemas II-3-1 (sentido 1) e II-3-2 (sentido 2) 69
- 17 - Cromatografia bidimensional da substância T (ST), 3-0-metilquercetina (3MQ) e da mistura ST + 3MQ nos sistemas II-4-1 (sentido 1) e II-4-2 (sentido 2) 70
- 18 - Cromatogramas CLAE do macerado purificado (1), do macerado purificado adicionado de 3-0-metilquercetina (2), adicionado de 3-0-metilquercetina e eupatorina (3), adicionado de quercetina, 3-0-metilquercetina e eupatorina (4) e das substâncias referência quercetina (5), 3-0-metilquercetina (6) e eupatorina (7) 71
- 19 - Espectros UV das soluções metanólicas de 3-0-metilquercetina. 1=padrão; 2 = padrão eluído do cromatograma; 3=substância Teluída do cromatograma do extrato turbolizado e 4=do extrato turbolizado purificado após cromatografia 73
- 20 - Espectros UV das soluções metanólicas de eupatorina. 1=padrão; 2=padrão eluído do cromatograma; 3=de eupatorina do extrato turbolizado e 4=do extrato turbolizado purificado após cromatografia 74

Figura	Página
21 - Perfil cromatográfico para o extrato turbolizado por CCD. $\textcircled{\ominus}$ = mancha vermelha; $\textcircled{\oplus}$ = mancha amarela 3-0-metilquercetina (3MQ); $\textcircled{\otimes}$ = eupatorina	91
22 - Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal	93
23 - Volume de óleo essencial (-) e perda por dessecação (---) em função do tempo de armazenamento da matéria-prima vegetal	95
24 - Perfil cromatográfico da substância T (.), do flavonol 3-0-metilquercetina (Δ) e da sua mistura (\square)	102
25 - Curvas padrão de 3-0-metilquercetina no UV a 358nm	107
26 - Curvas padrão de eupatorina no UV a 342nm	108
27 - Relação entre absorvância do padrão e absorvância do padrão após eluição da sílica-gel	110
28 - Curva padrão de 3-0-metilquercetina (3MQ) por CLAE	111
29 - Curva padrão de eupatorina (EUP) por CLAE	112
30 - Projeto fatorial ortogonal do tipo 2^3 das substâncias 3MQ e EUP, obtidas por CLAE, dos macerados purificados (MCP)	114
31 - Correlação entre o resíduo seco purificado (RSP) e as concentrações de 3-0-metilquercetina (3MQ) (- \ominus -) e eupatorina (EUP) (-- Δ --) dos macerados	120

LISTA DE ABREVIATURAS

- Abs. - absorvância
- AC - análise cromatográfica
- AG - análise granulométrica
- AV - análise da variância
- BV - balão volumétrico
- Br - brucina
- CG - classe granulométrica
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CP - cromatografia em papel
- CV - coeficiente de variação
- CLV - cromatografia líquida a vácuo
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- DE - decocto
- DEP - decocto purificado
- EF - espectrofotômetro ultravioleta - visível - Shimadzu
U.V. Visible Recording - UV-240 com registrador
Shimadzu Graphic Printer PR-1
- EG - espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman-124 com re-
gistrador Perkin-Elmer-56
- EUP - eupatorina
- EP - extrato purificado
- ET - extrato turbolizado
- ETP - extrato turbolizado purificado

- F - fração retida no tamis em percentagem
- FM - fase móvel
- IA - índice de amargor
- IE - índice de espuma
- ICN - Instituto de Ciências Naturais
- LU - luteolina
- \bar{m} - dimensão granulométrica média (mm)
- Δm - intervalo de abertura de malha (mm)
- MC - macerado
- MCP - macerado purificado
- 3MQ - 3-0-metilquercetina
- P - fração passagem percentual
- Q - quercetina
- R - fração resíduo percentual
- RSP - resíduo seco purificado
- RST - resíduo seco total
- SA - solução-amostra
- SC - solução comparativa
- SE - sistema eluente
- sh - shoulder (ombro)
- SI - solução inicial
- SM - solução-mãe
- SMe - solução metanólica
- SP - solução de partida
- SR - substância referência
- ST - substância T
- tc - valor calculado da amostra relativo à distribuição 't'
- TE - teor de extrato
- UV - ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O emprego de medicamentos de origem vegetal, por uma parcela significativa da população, leva a crer que a fitoterapia tem seu lugar assegurado no contexto social (MENßEN, 1981), no entanto, seu uso é discutido e quase sempre baseado em informações populares, de onde passa a ser estudado cientificamente (FARNSWORTH et alii, 1985a; NEARING, 1985).

A esperança demonstrada por FARNSWORTH (1985) em sua explanação ao afirmar que "É mais provável que nas próximas décadas se descubram, nos países em desenvolvimento, mais substâncias ativas novas de origem vegetal que os produzidos por todos os químicos em conjunto dos países desenvolvidos", coloca o programa de apoio e incentivo da Central de Medicamentos (CEME, 1988) sobre a produção de fitoterápicos, como projeto viável e praticável pelas Instituições de pesquisa, não só no aspecto químico e farmacológico, mas também no campo ecológico, do cultivo e do controle de qualidade.

A ausência de maior número de estudos sobre estes últimos aspectos, tem levado a falta de confiabilidade no uso da fitoterapia pelos profissionais da área de saúde.

O desenvolvimento de metodologias para assegurar a qualidade, que ofereçam exatidão e reprodutibilidade, prática recente em nosso meio, vem garantir a segurança do uso de fitoterápicos.

A importância do asseguramento e da manutenção da qualidade tem sido discutida por diversos autores (BERNHARD, 1980; SPAICH & GRACZA, 1980 e MENßEN, 1981).

A ocorrência de plantas de uso medicinal com potencial econômico e farmacológico deve ser estudada para que possam ser utilizadas pelo sistema de saúde, do qual participa em última instância a população.

No entanto, para que esta população seja beneficiada e utilize a fitoterapia, é necessário que a qualidade dos fitoterápicos vegetais seja assegurada, através da identificação botânica e farmacognóstica, ensaios e testes de caracterização, pureza, propriedades físicas, físico-químicas, químicas e biológicas, quantificação, toxicidade, aspectos tecnológicos, dando relevância ao controle de qualidade (HALBACH, 1983).

O conhecimento dos grupos de constituintes semelhantes estruturalmente ou de substâncias ativas quimicamente definidas, aos quais relacionam-se os efeitos farmacológicos e terapêuticos é imprescindível para o preenchimento dos quesitos acima citados.

Entre as classes de substâncias de atividade biológica reconhecida podem ser citados os flavonóides aos quais relacionam-se diversas ações tais como:

- ação sobre o coração e sistema circulatório;
- ação anti-hepatotóxica, colerética, anti-úlceras, antinefrótica;
- influência de outros estados patofisiológicos: espasmolítico, broncoespasmolítico, antiflogístico;

- ação sobre as células: proteção contra danos causados pelas radiações, mutagenicidade, inibição da proliferação linfocitária causada por concavalina A;
- ação bactericida, fungistático e virustático;
- inibição da atividade de diversas enzimas, entre elas β -glicuronidase, hialuronidases, arilsulfatases, fosfodiesterases (ZEPERNICK et alii, 1983; WEIß, 1985; SCHILCHER, 1987; STEINEGGER & HÄNSEL, 1988).

Também para alguns constituintes flavonoídicos encontrados em *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) como quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina foi descrita ação hepatoprotetora (SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987) e para 3-O-metilquercetina ação antiviral (VLIETINCK, 1987). A presença de compostos deste tipo permite o desenvolvimento de métodos de controle de qualidade, como já demonstrado em dissertação sobre *Achyrocline satureioides* (marcela) (SONAGLIO, 1987).

O conhecimento dos constituintes químicos do vegetal foi estabelecido por vários pesquisadores, fazendo com que os métodos analíticos e tecnológicos sejam facilitados.

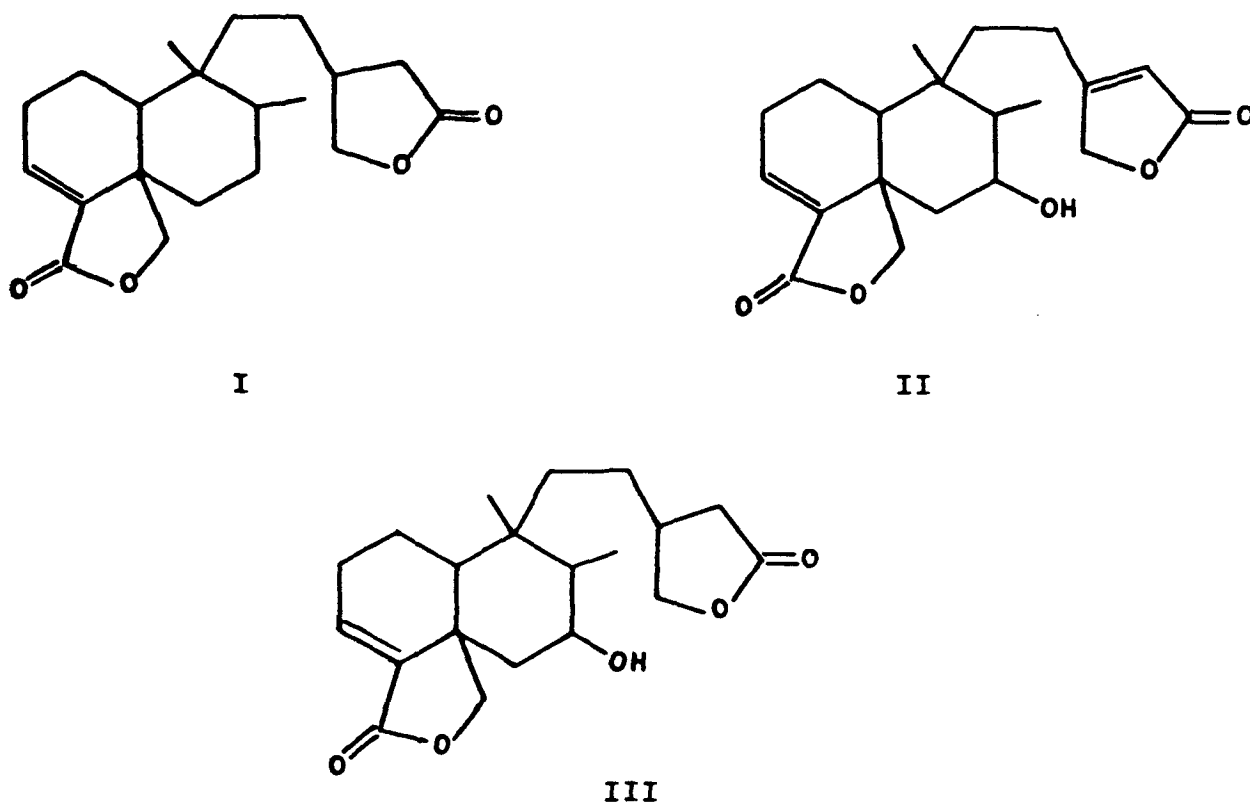
NAVES (1959 e 1959a) estudando a composição do óleo volátil da carqueja, identificou o ledol, o carquejol, o beta pineno e como componente majoritário, o acetato de carquejila (55%).

DOLEJS et alii (1961) identificaram na fração sesquiterpênica do óleo volátil de *Baccharis genistelloides* Persoon, delta e gama cadineno, calameneno, elemol, eudesmol e palustrol.

BAUER et alii (1973) por cromatografia em fase gasosa do óleo volátil de *Baccharis genistelloides* Persoon identificaram alfa

e beta pineno, canfeno, carquejol e acetato de carquejila (69,2%), portanto, com percentual superior ao encontrado por NAVES (1959a).

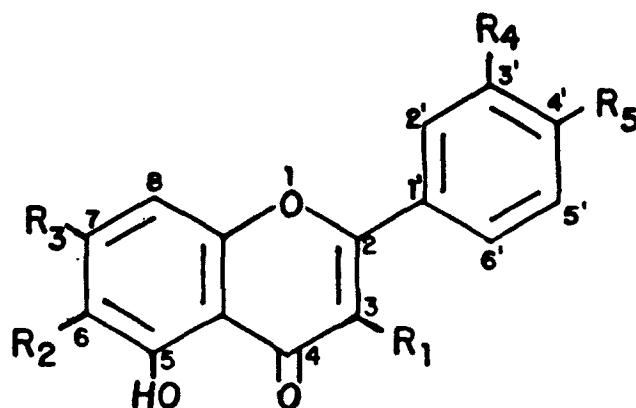
VICHNEWSKI (1976) e HERZ et alii (1977) identificaram três lactonas diterpênicas do tipo ent-clerodano (I, II e III) e uma flavona (eupatorina) (Figura 1).



SANTOS FILHO (1979) obteve resultados satisfatórios para alguns ensaios farmacológicos com as substâncias I, II, III e IX.

SOICKE & LENG-PESCHLOW (1987) estudando o extrato de acetato de etila, isolaram e identificaram 5 flavonóides (quercetina, luteolina, nepetina ou eupafolina, apigenina e hispidulina) (Figura 1), demonstrando também a propriedade anti-hepatotóxica dessas substâncias em camundongos intoxicados com fa-

loidina. O mesmo teste para biflavonóides demonstrou atividade anti-hepatotóxica contra a ação letal da faloidina e alfa-amanitina (IWU et alii, 1987).



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
IV	QUERCETINA	OH	H	OH	OH	OH
V	LUTEOLINA	H	H	H	OH	OH
VI	NEPETINA	H	OCH ₃	H	OH	OH
VII	APIGENINA	H	H	H	H	OH
VIII	HISPIDULINA	H	OCH ₃	H	H	OH
IX	EUPATORINA	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃

FIGURA 1 - Flavonóides isolados e identificados em *Baccharis trimera* (Less.) DC. (VICHNEWSKI, 1976; HERZ et alii, 1977; SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987).

A preparação de um extrato otimizado é uma operação muito delicada e requer conhecimento dos ingredientes ativos e de sua estabilidade, ou seja, para preparar um extrato de qualidade, necessita-se de controles analíticos (BONATI, 1980). Dentre os métodos adequados ao controle extrativo ou de substâncias, incluem-se as técnicas cromatográficas.

A utilização destas técnicas permite a avaliação qualitativa ou a quantificação direta, através do emprego da cromatografia líquida de alta eficiência, ou líquida em fase gasosa ou ainda, indiretamente, com o uso de cromatografia em papel, em coluna ou em camada delgada, seguida da eluição do cromatograma e subsequente determinação química (volumetria) ou físico-química (UV, fotocolorimetria, densitometria).

O emprego da cromatografia em papel (CP) em medidas quantitativas e de seu uso em processos de análises de substâncias flavonoídicas tem sido prática rotineira (RIBÉREAU-GAYON, 1968; SRIVASTAVA & KISHORE, 1985). O uso da CP associada ao UV como método de quantificação para flavonóides (quercetina), demonstrou eficácia pela exatidão e reprodutibilidade (SONAGLIO, 1987).

O principal valor da cromatografia em camada delgada (CCD) em trabalhos com flavonóides é de um método analítico rápido, o qual requer pequena quantidade de material, além de possuir diversidade de utilização da cromatografia em coluna e a separação da cromatografia em papel (RIBÉREAU-GAYON, 1968). A identificação por cromatografia e o isolamento em pequena escala de flavonóides puros são alguns dos usos particulares da CCD para esta classe de compostos (MARKHAM, 1982).

O método indireto de quantificação em CCD envolvendo eluição de manchas cromatográficas e o exame da sua absorvância por espectrofotometria no ultravioleta foi analisado e comparado com outros métodos diretos para *Anacardium occidentale*, tendo sido validado, mas que requer experimentação preliminar extensiva e condições controladas cuidadosamente para que a operação tenha sucesso (TYMAN, 1978). Não pode ser descartado

o uso da CCD associada a uma técnica química ou físico-química na quantificação de substância em extrativos mesmo de complexidade conhecida.

Levando-se em consideração que outras técnicas de exame direto de quantificação são de maior facilidade, e que dentre estas encontra-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), verifica-se seu uso difundido com este objetivo, para extrativos vegetais (WULP & NAGEL, 1976; SCHUSTER, 1980; GALENSA & HERRMANN, 1980; DAVYDOV et alii, 1981; ALONSO et alii, 1986; REVILLA et alii, 1986; ALVAREZ & KUSUMOTO, 1987).

Para a produção de extrativos vegetais estandardizados, alguns fatores devem ser considerados tais como:

- estágio de desenvolvimento do vegetal na colheita;
- concentração de substância ativa na planta, dependente de outros fatores (genéticos, ambientais, edáficos);
- secagem da droga vegetal objetivando a estabilização;
- preparação da droga, retirando impurezas e realizando sua divisão (moagem);
- armazenamento adequado evitando ação de destruição que possa descaracterizar a matéria-prima;
- extração com líquido extrator adequado e por métodos que permitam alcançar o maior rendimento pelo menor custo operativo.

Na extração nem sempre utiliza-se somente um eluente, mas misturas de etanol, metanol ou acetona com água. Entretanto o meio extrativo depende, sobretudo, da solubilidade das substâncias a extrair e de sua estabilidade (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982a).

A manutenção da(s) substância(s) ativa(s) é uma das preocupações na extração, devendo, portanto, ser realizada de maneira cuidadosa, mesmo considerando perda no rendimento.

Objetivando a extração da(s) substância(s) ativa(s), considerando-se a(s) solubilidade(s) e estabilidade, os métodos de extração maceração e percolação se prestam a este fato (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982a).

A maceração é o procedimento mais simples de extração, devendo sofrer agitações ocasionais, ser realizada ao abrigo da luz solar direta, evitando assim possíveis reações ou alterações de coloração catalisadas pela luz, além de sofrer agitações repetidas. O tempo de extração é relativo e depende de cada droga. Em geral oscila entre 5 e 10 dias. As agitações se prestam a garantir a compensação de concentração das substâncias extrativas no líquido extrator (mênstruo). Promove-se a separação entre o extrato (micela) e o resíduo por prensagem (prensa hidráulica). Procede-se a lavagem do resíduo para compensar perdas por evaporação ou mesmo para obter substâncias extrativas retidas na prensagem. Face aos fenômenos físicos da extração sólido-líquido em sistemas cuja concentração do solvente é fixa, a maceração não leva ao esgotamento do material.

Um método moderno e derivativo da maceração é a turboextração ou turbolização, aplicado sobretudo para a preparação rápida de pequenas quantidades de extratos. Submete-se a droga e o mênstruo, à ação de misturadores de grande velocidade (cerca de 10.000 rotações por minuto). Dessa forma aceleram-se os fenômenos de dissolução, sendo suficientes 5 a 20 minutos, dependente de cada caso. Deve-se excluir a perda de solvente por fechamento hermético do recipiente, além do

cuidado com a temperatura durante o processo, para não ultrapassar 40°C (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982a).

O processo de percolação é uma técnica de extração onde pode-se conseguir cerca de 95% de substâncias extraíveis. Isto é possível pela renovação constante do solvente no local de extração.

Alguns procedimentos são afins a percolação como a re-percolação, evacolação, diacolação e método Soxhlet. Para fins industriais a extração em contracorrente é um procedimento adequado.

A análise fatorial ou projeto fatorial é um plano de otimização de experimentos, especificando o número de experimentos a ser representado e a seqüência da variação dos fatores, tornando-se possível determinar os coeficientes pelo método dos mínimos quadrados, com um mínimo de erro (VIRAG, 1970).

O projeto fatorial é usado para determinar a ocorrência de interações entre os fatores citados anteriormente e o vegetal em estudo com o objetivo de determinar qual ou quais fatores causa ou causam compatibilidade ou incompatibilidade (LEUENBERGER & BECHER, 1975). Assim, os efeitos de estabilização ou desestabilização dos fatores individualmente nos extrativos poderiam ser evidenciados.

Nas ciências farmacêuticas a análise fatorial tem sido utilizada principalmente com os seguintes objetivos: 1º) análise quantitativa como na determinação das relações quantitativas dos componentes de formulações qualitativamente conhecidas. 2º) análise qualitativa, como na determinação das qualidades ótimas dos componentes de formulações quantitativamente conhecidas (LEUENBERGER & BECHER, 1975).

A montagem do projeto experimental para a otimização de formulações farmacêuticas utiliza-se de modelos estatísticos que permitam inicialmente assegurar a validade dos resultados, diminuir a possibilidade de erros aleatórios e avaliar a influência dos diversos fatores sobre a qualidade do produto obtido.

O projeto fatorial, desenvolvido inicialmente por YATES & HALE (1939) para experimentos agronômicos, tem encontrado com algumas modificações aplicação na área farmacêutica (NEWTON et alii, 1971; SCHWARTZ et alii, 1973; SCHWARTZ et alii, 1973a; DINÇER & ÖZDURMUŞ, 1977; STEWART et alii, 1979; BOLTON, 1983; DÉVAY & RÁCZ, 1984).

Como a análise fatorial é racional e procede-se por valores obtidos de quantificação, os métodos utilizados CCD/UV e CLAE são prontamente úteis somado ao fato da presença de substâncias conhecidas e amplamente difundidas no reino vegetal, facilitando sobremaneira o uso desta análise para extrativos vegetais.

Dessa maneira, observa-se neste trabalho além do envolvimento das investigações botânicas, fitoquímicas e farmacológicas, a preocupação tecnológica na produção de fitoterápicos otimizados de plantas de uso difundido entre a população.

Empregando as sumidades aéreas floridas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. - Compositae, popularmente denominada carqueja, objetiva este trabalho estabelecer metodologia para o controle de qualidade da droga como matéria-prima, produto intermediário do ciclo produtivo e como produto final sob a forma de um macerado hidroalcoólico. A influência de fatores como

concentração etanólica do líquido extrator, granulometria da droga e tempo de maceração foi avaliada através de um delineamento estatístico por análise fatorial.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-Prima Vegetal

O material botânico, objeto de estudo, foi coletado em agosto de 1986, no período de floração indistintamente exemplares masculinos e femininos, no município de Sertão do Santana, RS. Foi identificado pela Profª Lillian Auler Mentz, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O material testemunho encontra-se registrado sob número 67.228 do Herbário ICN na mesma Universidade.

O vegetal, grosseiramente rasurado, foi posto a secar em estufa de ar circulante a 35°C por 9 dias e armazenado em lugar fresco, ao abrigo da luz solar.

Após moagem do material rasurado em moinho de martelos articulados, foi feita tamisação com jogo de tamises em mm: 2,000; 1,600; 1,000; 0,800; 0,630; 0,400; 0,315; 0,200 e coletor. As frações de escolha foram as com abertura de malha 0,800-0,630mm e 0,400-0,315mm.

2.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- alcoômetro de Gay-Lussac a 20°C - Arba - 0-100

- aparelho de Clevenger modificado (VAN'OS, 1965)
- aparelho de destilação para determinação do teor alcoólico (FARMACOPÉIA, 1977)
- aparelho de tamisação vibratório Retsch com tamises DIN 12791 - série 4188
- areômetro DIN 12791 - série M100
- balança analítica - Sartorius tipo 2402
- banhos de água - Fanem e Köttermann tipo 3024
- bomba de vácuo - Fanem modelo CAL com vacuômetro de 0-760mm Hg (0-101kPa)
- cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo CG-480 C com injetor Rheodyne munido de alça doseadora de 20µl, detector de comprimento de onda variável CG-435 e integrador-processador modelo CG-300
- espectrofotômetro ultravioleta-visível - Shimadzu U.V. Visible Recording - UV-240 com registrador Shimadzu Graphic Printer PR-1 (EF)
- espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman-124 com registrador Perkin-Elmer-56 (EG)
- estufa de ar circulante Memmert modelo Tv 60µL
- estufa a vácuo Heraeus modelo RVT 360
- lâmpada universal de quartzo - Mineraluz GM-24 - 254 e 366nm
- minisom Thornton tipo nº 0677119 - 40 KHz/60W
- moinho de martelos articulados - Ganasini
- pHmetro Knick pH-mV-Meter - tipo 520
- prensa hidráulica manual Hafico para 5l
- turbolizador Arno-multiprocessador

2.1.3 Reagentes, Soluções, Substâncias Reagentes e Referências

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuem grau de pureza pró-análise (p.a.). Foi utilizado etanol comercial 93,6^oGL aproximadamente 93,6INPM (firma PEREIRA).

SOLUÇÕES

- solução de ácido fosfórico a 1% (V/V);
- solução de carbonato de sódio 0,2M (m/V);
- solução de urotropina a 0,5% (m/m);
- solução hidroalcoólica I (etanol: água; 50:50; V/V);
- solução hidroalcoólica II (etanol: água; 70:30; V/V);
- solução metanólica de ácido acético glacial a 5% (V/V);
- solução tampão de fosfato pH 7,00 ± 0,01 (20^oC);
- solução tampão de citrato-ácido clorídrico pH 4,00 ± 0,01 (20^oC).

SUBSTÂNCIAS REFERÊNCIAS

- brucina cristalizada (MERCK^{a)});
- eupatorina^{b, c)});
- luteolina^{a)});
- 3-0-metilquercetina^{d)});
- quercetina (MERCK^{a)}).

As substâncias de referência foram cedidas por:

- a) Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel - UFRGS - Porto Alegre-RS
- b) Prof. Dr. Shin Matsuura - 10-Wakafuku-Cho, Gifu, 502-Japan
- c) Prof. Dr. Davi dos Santos Filho - Faculdade de Farmácia - USP - Ribeirão Preto-SP
- d) Prof^a M.F. Cláudia Maria Oliveira Simões - UFSC - Florianópolis-SC

2.1.4 Material para Cromatografia

2.1.4.1 Adsorventes

- sílicagel 60 para cromatografia em coluna - tamanho de partícula 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) - artigo nº 7734; Firma Merck; lote nº 20304;
- sílicagel 60 GF₂₅₄ para cromatografia em camada delgada - artigo nº 7730; Firma Merck; lote nº 506TA 753430;
- sílicagel 60 PF₂₅₄ silanizada para cromatografia preparativa em camada - artigo nº 7751; Firma Merck; lote nº 5017958;
- celulose microcristalina para cromatografia em camada delgada analítica Sygmacell tipo 20 - artigo nº S-3504; Firma Sigma; lote nº 18C-0373;
- papel de filtro comum, cor branca, com gramatura 138g/cm².

2.1.4.2 Equipamentos

- aparelho para preparação de cromatoplasmas da Desaga;
- cuba de vidro para cromatografia (dimensões internas: 22 x 22 x 10cm) com tampa de vidro;
- aspersor-nebulizador de vidro com capacidade para 100ml.

2.1.4.3 Detecção das manchas cromatográficas

- luz visível;

- luz UV a 254 e 366nm;
- vapores de amônia, seguido de observação sob luz UV a 254 e 366nm;
- R1: solução de sulfato cérico a 10% (m/V) em ácido sulfúrico 2N (MERCK, 1971);
- R2: solução alcoólica de vanilina sulfúrica a 3% (m/V) (MERCK, 1971);
- R3: solução oxalo-bórica (LÖHDEFINK, 1976);
- R4: solução metanólica de cloreto férrico a 1% (m/V) (STAHL, 1969; STAHL et alii, 1970).

Após nebulização com R1 e R2 as cromatoplacas foram aquecidas em estufa a 110°C durante 5 a 10 minutos. R3 e R4 foram utilizados sobre cromatoplacas de celulose microcristalina, sem sofrerem aquecimento posterior.

2.1.4.4 Solventes

Os solventes possuíam grau de pureza pró-análise exceto os empregados para a cromatografia líquida de alta eficiência de qualidade compatível (Lichrosolv, Merck).

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Caracterização Botânica

O vegetal foi examinado com auxílio de lupa, sob iluminação artificial, dando-se maior ênfase aos elementos constituintes das sumidades floridas (segundo CABRERA, 1974; BARROSO, 1976).

2.2.2 Determinação do Índice de Amargor (FARMACOPÉIA, 1959a)

2.2.2.1 Preparação da solução referência de brucina

Em um balão de 1000,0ml, adicionou-se 0,092g de brucina cristalizada Merck, de fórmula $C_{23}H_{26}O_4N_2 \cdot 2H_2O$, 100ml de álcool R (FARMACOPÉIA, 1959a) e completou-se o volume do balão com água potável. Retirou-se desta solução, alíquota de 10,0ml com auxílio de pipeta, para um balão volumétrico de 1000ml, completando-se o volume com água potável, obtendo-se uma diluição de 1:1.000.000 (solução de partida-SP).

A partir da SP foram preparados mais nove diluições com títulos de 1 para: 1.650.000; 2.050.000; 2.550.000; 3.200.000; 4.000.000; 5.000.000; 6.250.000; 7.800.000 e 9.750.000.

2.2.2.2 Preparação das soluções de decocto e extrato turbolizado

2.2.2.2.1 Preparação das diluições do decocto (DE) (PAVAN, 1952)

Preparou-se um decocto de acordo com a FARMACOPÉIA Brasileira (1959), retirando-se fração de 20,0ml, para um balão volumétrico de 100ml, completando-se o volume com água potável (solução inicial-SI). Partindo-se da SI, procedeu-se o preparo de dez diluições com os seguintes títulos de 1 para: 200; 400; 600; 800; 1.000; 2.500; 4.000; 5.000; 10.000 e 50.000.

2.2.2.2.2 Preparação das diluições do extrato turbolizado (ET)

Com alíquota de 10,0ml do ET (2.2.15.3), completou-se o volume com água potável, em balão volumétrico de 100ml, obtendo-se uma diluição de título de 1 para 100. Partiu-se desta solução no preparo de seis diluições com títulos de 1 para: 1.000; 2.500; 4.000; 5.000; 10.000 e 50.000.

2.2.2.3 Verificação do índice de amargor (IA)

Procedeu-se a verificação a partir da solução referência de brucina. Lavou-se a boca com água potável e em seguida, com 10ml da solução mais diluída (1:9.000.000), fez-se bochecho durante 10segundos, lavando-se a boca em seguida com água potável. Decorridos 10minutos, procedeu-se da mesma forma que a anterior, com a solução de título imediatamente superior, até encontrar uma solução de sabor duvidosamente amargo e a seguinte de sabor distintamente amargo (WASICKY et alii, 1943). Desta última solução, foram preparadas mais duas soluções, reduzindo-se as concentrações cada vez em 10% da anterior, localizando-se assim o limiar da sensação de amargor a limites mais ou menos reduzidos.

Passados 10minutos do ensaio com a solução de referência de brucina, testou-se as soluções do decocto como acima descrito. Após procedeu-se da mesma maneira com as diluições do ET, utilizando-se três pessoas para a verificação do IA.

O cálculo do IA é fornecido, segundo a fórmula (WOJAHN, 1951a)

$$IA = \frac{DA}{DP} \cdot 100.000 \quad (1)$$

onde:

DA = maior diluição da amostra (DE ou ET) que produziu sensação de amargor distinto;

DP = diluição do padrão de brucina onde foi distinta a sensação de amargor.

O resultado é fornecido pela média de três determinações.

2.2.3 Determinação do Índice de Espuma (FARMACOPÉIA, 1977b)

2.2.3.1 Para o decocto (DE)

Cerca de 0,500g da droga tamisada total, foi colocada com 100ml de água destilada em erlenmeyer e postos a ferver durante 5 minutos. Juntou-se gotas de carbonato de sódio 0,2M até pH 7,0. Após o esfriamento filtrou-se e completou-se o volume a 100ml. Realizaram-se diluições do decocto com água destilada nas proporções de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100% em tubos de ensaio (16 x 160mm). Agitou-se vigorosamente cada tubo por 15 segundos, deixou-se em repouso durante 15 minutos, observando-se em qual tubo ocorreria um anel de espuma com um mínimo de 1cm de altura.

2.2.3.2 Para o extrato turbolizado (ET)

Retirou-se alíquota de 50ml do ET para um balão volumétrico de 100ml completando-se com água destilada. Neutralizou-se com carbonato de sódio 0,2M, diluindo e tratando as diluições como descrito no item 2.2.3.1.

Quando não houver a presença de espuma em nenhum dos tubos, diz-se que o índice de espuma (IE) é inferior a 100, caso contrário o resultado é obtido através da seguinte fórmula

$$IE = \frac{K \cdot 1000}{M \cdot V} \quad (2)$$

onde:

K = massa da droga, sempre com valor de 1g;

M = percentual da droga utilizada no preparo do extrato ou teor de planta no extrato em g;

V = volume do extrato no tubo de ensaio com espuma de 1cm de altura (sem a diluição, ou seja, volume original, em ml);

1000 = 10ml x 100ml (diluição do tubo x preparo do extrato).

O resultado é fornecido pela média de três determinações.

2.2.4 Determinação do pH

Foi realizado em pHmetro calibrado com soluções tampão de fosfato e citrato-ácido clorídrico, pH 7,00 e 4,00, respectivamente.

2.2.5 Determinação da Perda por Dessecação (FARMACOPÉIA, 1977c; WOJAHN, 1951)

Pesaram-se exatamente cerca de 2g de droga, em pesa-filtro (dimensões internas, 27 x 55mm) previamente tarado. Colo-

cou-se em estufa a 105°C por 2 horas, deixou-se esfriar em dessecador durante 30 minutos, pesando-se a seguir. Após, recolocou-se em estufa por mais 30 minutos, repetindo-se o processo até peso constante.

Determinou-se a perda por dessecação nos períodos de 0, 5, 9 e 20 meses de armazenamento.

Os resultados foram expressos em percentagem ponderal (m/m) sobre a quantidade da droga, através da média de seis determinações.

2.2.6 Determinação do Resíduo Seco (BÖHME & HARTKE, 1981)

Em pesa-filtro (dimensões internas, 27 x 55mm), previamente tarado, pesaram-se exatamente cerca de 20g do extrato, evaporou-se sobre banho de água fervente, sob movimentação constante. Após evaporação completa, colocou-se em estufa a 105°C por 2 horas, deixou-se em dessecador por 25 minutos para esfriar e pesou-se. O resultado é calculado em relação a 100g do extrato, pela média de 3 determinações.

2.2.7 Determinação do Teor Alcoólico

2.2.7.1 Para o extrato turbolizado (ET) (FARMACOPÉIA, 1977; DÄRR, 1979)

Foi realizado segundo o método da destilação, usando-se tratamento especial com cloreto de sódio, e o teor alcoólico foi determinado através da densidade, a 25°C, com auxílio de picnômetro e da tabela alcoométrica. Determinou-se no ET

antes da destilação o teor alcoólico com auxílio do areômetro. O resultado é fornecido em percentual volumétrico, a 15,56°C.

2.2.7.2 Para os macerados (MC) (DÄRR, 1979)

Utilizou-se areômetro, a 15°C, e alcoômetro de Gay-Lussac, a 20°C, e determinou-se o teor alcoólico pela densidade com auxílio da tabela alcoométrica. O resultado é fornecido em percentual volumétrico, a 15,56°C.

2.2.8 Determinação do Teor de Extrativo (BUNDESVEREINIGUNG, 1979)

Cerca de 1g da droga moída com granulometria (0,630-0,315mm), exatamente pesada, foi aquecida à fervura com 100g de água destilada durante 10 minutos. Esfriou-se, completou-se a água evaporada a 100g e filtrou-se. Desprezou-se os primeiros 20ml. Do restante do filtrado, pesaram-se exatamente cerca de 20g e determinou-se o resíduo seco conforme técnica descrita no item 2.2.6.

O teor de extrativo (TE) foi calculado segundo a fórmula

$$TE = \frac{g \cdot 500}{p} (\% \text{ m/m}) \quad (3)$$

onde:

g = massa do resíduo seco em g;

p = massa da droga em g.

2.2.9 Determinação do Teor de Flavonóides Totais (BUNDES- VEREINIGUNG, 1979a)

Colocou-se em balão de fundo redondo de 100ml, 0,400g de droga moída com granulometria 1,000-0,800mm, exatamente pesados, acrescidos de 1ml de uma solução de urotropina a 0,5% (EUROPEAN, 1969), 20ml de acetona R (EUROPEAN, 1969) e 2ml de ácido clorídrico R (EUROPEAN, 1969) e aqueceu-se sobre manta de aquecimento, mantendo sob refluxo, por 30 minutos. Filtrou-se através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100ml. Lavou-se o resíduo da droga e o algodão, em balão de fundo redondo, com duas porções de 20ml de acetona, sob refluxo, por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. Em funil de separação, foram adicionados, 20ml da solução acetônica, 20ml de água destilada e extraídos com 15ml de acetato de etila R (EUROPEAN, 1969), repetindo-se por três vezes, com porções de 10ml.

As frações de acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50ml de água destilada e colocadas em balão volumétrico de 50ml, completando-se o volume com acetato de etila (solução-mãe-SM).

Adicionou-se 1ml do reagente de cloreto de alumínio¹ (BÖHME & HARTKE, 1981a) a 10ml da SM, diluindo-se a 25ml com solução metanólica de ácido acético R² (BÖHME & HARTKE, 1981a) (solução-amostra-SA). Ao mesmo tempo, 10ml da SM foram diluí-

-
1. Reagente de cloreto de alumínio: a 1,0g de $AlCl_3$ em balão volumétrico de 50ml, completar com solução metanólica de ácido acético (HAc) a 98%.
 2. Solução metanólica de HAc R: em balão volumétrico de 100ml adicionar 5ml de HAc a 98% e completar com metanol.

dos a 25ml com solução metanólica de ácido acético R (solução-comparativa-SC). Após 30 minutos mediu-se a absorvância da SA a 425nm, em cubeta com 1,000cm de espessura contra SC.

O cálculo do teor baseia-se na absorvância específica da quercetina, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$, segundo a fórmula

$$Q = \frac{\text{Abs.} \times 62.500}{500 \times e \times (100-t)} (\% \text{ m/m}) \quad (4)$$

onde:

Abs. = absorvância medida;

e = massa da droga em g;

t = perda por dessecação (% m/m).

O resultado é fornecido em percentual (m/m) de flavonóides calculados como quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$).

2.2.10 Determinação do Teor de Óleo Essencial (FARMACOPÉIA, 1977a; BRITISH, 1980)

Procedeu-se conforme método I de dosagem de óleos essenciais nas drogas vegetais, por arraste de vapor d'água, em aparelho de Clevenger modificado (VAN'OS, 1965).

Pesaram-se 100g de planta rasurada colocando-se em balão de fundo redondo com 500ml de água destilada e realizou-se a destilação por 3 horas (SILVA & GROTTA, 1971). O óleo foi medido, acrescido de 0,5ml de n-hexano puríssimo e pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, acondicionando-se em frasco âmbar e armazenando a -10°C .

O teste foi realizado no tempo zero de armazenamento.

Para os resultados, considerou-se o volume de óleo es-

sencial em 100g de droga e em percentagem da droga dessecada.

2.2.11 Teste de Saponinas (RIZK, 1982)

A detecção preliminar de saponinas foi realizada através do teste de espuma. Cerca de 0,500g da droga, exatamente pesados, foram colocados em tubo de ensaio e tratados com 10ml de água destilada a quente. Após resfriamento, agitou-se por 10segundos, vigorosamente. A formação de um anel de espuma de 1 a 10cm de altura, persistente por um mínimo de 10minutos, que não desaparece pela adição de algumas gotas de ácido clorídrico 2N, ocorre na presença de saponinas.

O resultado é fornecido pela expressão positivo ou negativo.

2.2.12 Análise Granulométrica (AG) (HELMAN, 1982)

Empregou-se a técnica da granulometria por tamisação. Determinaram-se os extremos com dois tamises, aberturas de malha de 2,000 e 0,200mm e coletor, escolhendo mais sete tamises intermediários, com abertura de malha de 1,600; 1,250; 1,000; 0,800; 0,630; 0,400 e 0,315mm, segundo a DIN 4188, tarando-os individualmente.

Pesaram-se 100g do vegetal moído em moinho de martelos articulados.

Tamisou-se o conjunto durante 25minutos a 70 vibrações por minuto utilizando-se tamisador vibratório RETSCH. Após a tamisação, procedeu-se a pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira.

O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha (Δm ; mm); dimensão granulométrica média (\bar{m} ; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %).

2.2.13 Análise Cromatográfica (AC)

Para cromatografia em papel e em camada delgada, partiu-se de 10ml do ET, reduzindo-se o volume a um quinto do volume inicial em banho-maria.

Para a cromatografia líquida a vácuo, evaporaram-se 20ml do ET com 1g de sílicagel 60 para cromatografia em coluna (item 2.1.4.1), deixando-se 24 horas em dessecador, após procedeu-se a eluição, realizando-se em seguida a análise cromatográfica em camada delgada das frações.

Utilizaram-se 3-O-metilquercetina (3MQ), quercetina (Q) e luteolina (LU) como substâncias referência (SR).

Alguns dos sistemas cromatográficos em papel e em camada delgada não foram utilizados para o ET e sim somente para as SR com finalidade de desenvolvimento da separação e auxiliar na identificação do flavonol 3-O-metilquercetina (substância T) (item 2.2.14).

Todos os sistemas cromatográficos foram desenvolvidos à temperatura ambiente.

2.2.13.1 Cromatografia em papel (CP)

Foram utilizadas tiras de papel de filtro comum (138g/cm²) como suporte, com dimensões de 15 x 25cm. As fases móveis testadas foram preparadas nas seguintes proporções de volume:

a - ácido acético glacial (MARKHAM et alii, 1969; MARKHAM, 1975)

1 - a 15%;

2 - a 30%;

3 - a 60%;

b - t-butanol: ácido acético glacial: água (TBA) (3:1:1) (MARKHAM et alii, 1969; MABRY et alii, 1970; MARKHAM, 1975);

c - n-butanol: ácido acético glacial: água (BAW) (6:1:2) (SWAIN, 1976).

A aplicação do ET e das SR foi feita com auxílio de microsseringa com capacidade para 100µl.

Utilizou-se a técnica de desenvolvimento ascendente em câmara saturada, até altura de aproximadamente 15cm. Após secagem do cromatograma ao ar livre, as manchas foram detectadas à luz visível e à luz UV 366nm antes e após exposição aos vapores de amônia.

2.2.13.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram preparadas em laboratório cromatoplasmas para CCD, com dimensões de 20 x 20cm, com as fases estacionárias especificadas abaixo, de espessura 0,250mm e as respectivas

fases móveis, cujas concentrações encontram-se expressas em proporção volumétrica.

I - Sílicagel 60 GF₂₅₄

- 1 - benzeno: acetato de etila (2:1), revelador:R1;
- 2 - benzeno: acetato de etila (3:1), revelador:R1;
- 3 - benzeno: acetato de etila (2:1), revelador:R2;
- 4 - benzeno: acetato de etila (3:1), revelador:R2;
- 5 - benzeno: metanol (15:1), revelador:R2;
- 6 - clorofórmio: metanol (15:1);
- 7 - benzeno: acetato de etila: metanol (75:25:5);
- 8 - tolueno: acetato de etila: metanol (75:25:5);
- 9 - tolueno: acetato de etila: metanol
(60: 35: 10);
- 10 - tolueno: acetato de etila: metanol (75:25:8);
- 11 - tolueno: acetato de etila: metanol
(65: 25: 10);
- 12 - tolueno: acetato de etila: metanol
(75: 25: 15) + ácido fórmico a 2%.

II - celulose microcristalina

- 1 - clorofórmio: ácido acético glacial:
água (50: 45: 5);
- 2 - t-butanol: ácido acético glacial: água (TBA)
(3: 1: 1) (MABRY et alii, 1970; MARKHAM,
1975);

- 3 - 1- clorofórmio: ácido acético glacial:
água (50: 45: 5),
2- t-butanol: ácido acético glacial:
água (TBA) (3: 1: 1),
revelador: R4;
- 4 - 1- t-butanol: ácido acético glacial:
água (TBA) (3: 1: 1),
2- clorofórmio: ácido acético glacial:
água (50: 45: 5),
revelador: R3.

III - sílicagel 60 PF₂₅₄ silanizada

- 1 - tolueno: acetato de etila: metanol
(75: 25: 5).

A detecção foi a mesma utilizada para a CP, acrescida dos reveladores R1 e R2 (item 2.1.4.3). As placas nebulizadas com R1 e R2 foram aquecidas em estufa a 110°C por 5 a 10 minutos.

Para a CCD com celulose microcristalina, empregaram-se os mesmos métodos de detecção para a CP, além dos reveladores R3 e R4 (item 2.1.4.3).

As cromatoplasmas com sílicagel foram ativadas a 120°C por uma hora antes de serem utilizadas.

Os cromatogramas foram desenvolvidos em cuba de vidro em sistema saturado, até altura de 15cm aproximadamente.

Os sistemas II- 3-1 e 2 e II- 4-1 e 2 foram empregados para cromatografia bidimensional, nas mesmas condições que os outros sistemas.

Para o sistema III-1 foram utilizadas placas cromatográficas de dimensões 60 x 20cm, preparadas em laboratório com camada de espessura de 0,500mm. Foram ativadas em estufa a 120°C por duas horas.

2.2.13.3 Cromatografia líquida a vácuo (CLV)

Após evaporação do ET em 1g de sílicagel 60 para cromatografia em coluna, preparou-se o filtro de vidro sinterizado afunilado (Duran 50, D2), Figura 2, no qual empacotaram-se a seco, 9g de sílicagel 60, cuidando-se para que formasse uma coluna homogênea (COOL & BOWDEN, 1986; PELLETIER et alii, 1986). A seguir iniciou-se a passagem de frações de 10ml do sistema eluente (SE) de menor polaridade (ciclohexano), até que este fluísse uniformemente e a fase estacionária ficasse consistente.

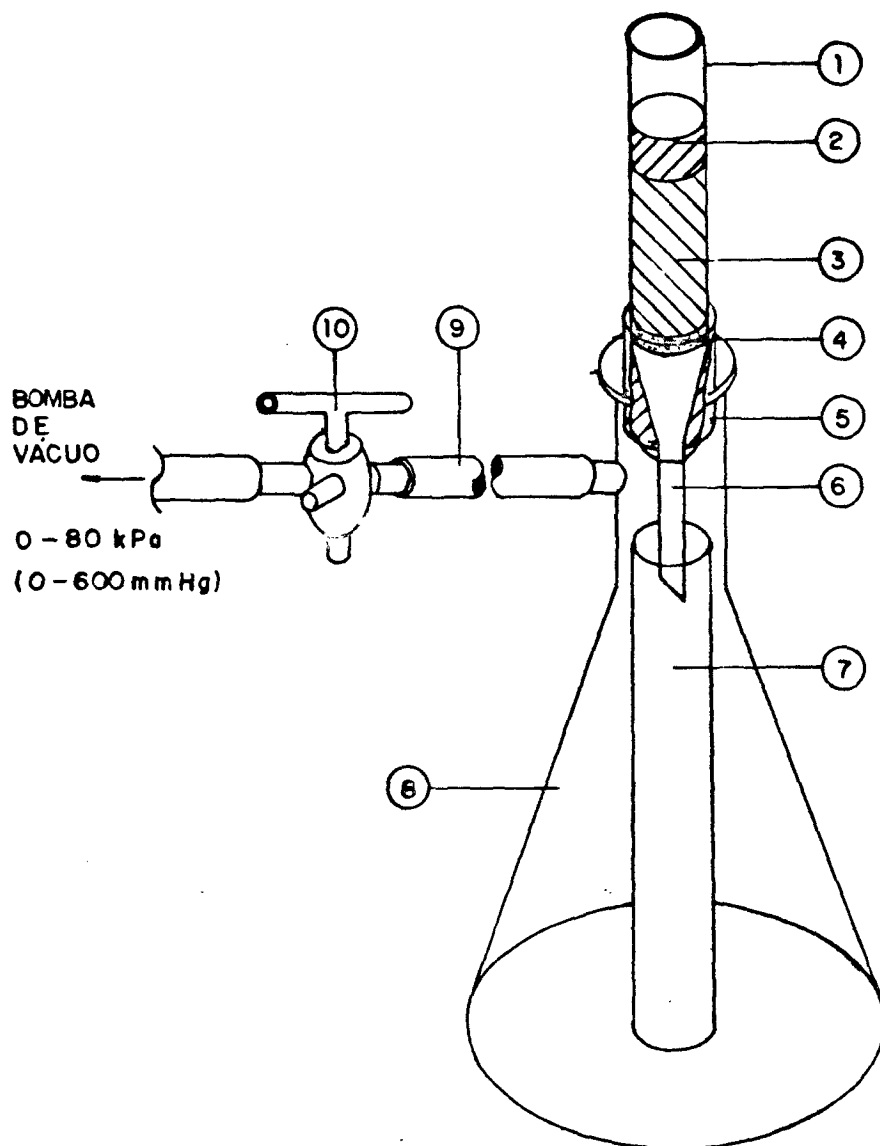
O eluente remanescente foi retirado por vácuo.

Colocou-se no topo da coluna o ET adsorvido na fase fixa, como descrito em 2.2.13, iniciando-se a eluição com 10ml da fase móvel de menor polaridade, sob vácuo. A bomba de vácuo foi ajustada para funcionar 2 minutos a 16kPa (\approx 120mm de Hg) e 4 minutos a 51kPa (\approx 380mm de Hg). Seguiu-se a adição dos sistemas eluentes em polaridade crescente de acordo com a Tabela 1.

O acompanhamento das frações foi realizado com o sistema cromatográfico I-9 (2.2.13.2).

TABELA 1 - Esquema de eluição para a cromatografia líquida a vácuo (CLV).

SISTEMA ELUENTE	PROPORÇÃO V/V
1 - ciclohexano	100
2 - ciclohexano:hexano	50:50
3 - hexano	100
4 - hexano: tolueno	50:50
5 - tolueno	100
6 - tolueno: clorofórmio	20:1
7 - tolueno: clorofórmio	17:1
8 - tolueno: clorofórmio	14:1
9 - tolueno: clorofórmio	8:1
10 - tolueno: clorofórmio	5:1
11 - tolueno: clorofórmio	4:1
12 - tolueno: clorofórmio	3:1
13 - tolueno: clorofórmio	2:1
14 - clorofórmio	100
15 - clorofórmio: acetato de etila	20:1
16 - clorofórmio: acetato de etila	17:1
17 - clorofórmio: acetato de etila	14:1
18 - clorofórmio: acetato de etila	8:1
19 - clorofórmio: acetato de etila	5:1
20 - clorofórmio: acetato de etila	4:1
21 - clorofórmio: acetato de etila	3:1
22 - clorofórmio: acetato de etila	2:1
23 - acetato de etila	100



- 1-FILTRO BÜCHNER DE VIDRO SINTERIZADO
- 2-SUBSTRATO, APÓS ADSORVIDO AO SUPORTE
- 3-ADSORVENTE
- 4-DISCO DE FILTRAGEM (ASTM DURAN 50 D-2)
- 5-JUNTA DE BORRACHA
- 6-FUNIL
- 7-TUBO PARA COLETAR AMOSTRA
- 8-FRASCO KITASATO
- 9-TUBO DE BORRACHA
- 10-TORNEIRA TRÊS VIAS

FIGURA 2 - Aparelho de laboratório para cromatografia líquida a vácuo (CLV).

2.2.13.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Utilizou-se para o desenvolvimento dos cromatogramas, como suporte coluna 10 μ m Hibar-Merck RP-18 (250 x 4mm d.i.), o sistema eluente metanol: ácido fosfórico a 1% (V/V) (40; 60; V/V), com fluxo de 2,0ml/minuto, detecção a 342nm, sensibilidade de 32mV, com velocidade de registro de 5mm/minuto. Todas as soluções foram injetadas em volume de 100 μ l.

Na determinação das condições de separação, utilizou-se, ainda, do sistema eluente metanol: ácido fosfórico a 1% (V/V) nas proporções de volume: 50:50; 60:40; 70:30, variando-se a velocidade de fluxo.

As amostras (EP) e substâncias referência foram filtradas por membrana de politetrafluoretileno, porosidade 0,22 μ m (Millipore, tipo FHLPO1300) e injetadas com auxílio de microseringa com capacidade para 100 μ l. Os sistemas eluentes foram filtrados através de filtro de politetrafluoretileno, de porosidade 0,459 μ m (SARTORIUS SM 11106), desgaseificados em minissom a 40KHz/60W por 10 minutos.

Os fatores de resolução com relação às substâncias referência 3MQ e EUP foram calculados através de equação (5) (MEYER, 1979):

$$R_i = 2(t_n - t_r) / (W_n + W_r) \quad (5)$$

onde:

R_i = fator de resolução do pico n adjacente ao pico de de 3MQ ou EUP;

t_n = tempo de retenção do pico n (cm);

t_r = tempo de retenção da substância referência 3MQ ou EUP (cm);

W_n = largura da base do pico n (cm) e

W_r = largura da base do pico da substância referência

3MQ ou EUP (cm).

2.2.14 Determinação do Flavonol 3-O-metilquercetina (Substância T)

Empregaram-se nesta determinação métodos espectroscópicos no UV e cromatográficos como CP, CCD, CLAE e CLV.

Realizou-se CCD, a partir do ET, de acordo com o item 2.2.13.2 com o sistema cromatográfico III-1, raspando-se a sílicagel correspondente a mancha com RF 0,21 e eluindo-se em banho de água quente a 67°C durante 2 horas com metanol. Filtraram-se através de membrana de politetrafluoretileno de porosidade 0,22 μ m (Millipore).

A solução metanólica (SMe) foi recromatografada no sistema I-6.

Com a SMe realizou-se espectroscopia no UV em espectrofotômetro (EG), tendo o registrador sensibilidade de 20mV e velocidade de registro de 20mm/minuto. Foram adicionados, separadamente, reativos a essa solução de forma a induzir deslocamentos no espectro de UV, seja por ionização e/ou quelação dos polihidroxifenóis, tais como: H_3CONa ; $AlCl_3$; $AlCl_3/HCl$; CH_3CH_2ONa ; CH_3CH_2ONa/H_3BO_3 (MABRY et alii, 1970a).

Para a obtenção do perfil cromatográfico da substância a partir da SMe, utilizaram-se CP, CCD e CLAE. Os sistemas para CP (item 2.2.13.1) foram: a, b e c; para CCD (item 2.2.13.2) os sistemas I-6; I-10; I-11; I-12; II-1; II-2; II-3 e II-4.

A CLAE foi desenvolvida nas mesmas condições referidas no item 2.2.13.4.

No desenvolvimento de todos os métodos cromatográficos foi utilizada a técnica da cocromatografia, empregando-se como substância referência 3MQ (item 2.1.3).

2.2.15 Métodos de Extração

Para as diversas análises realizadas, foram utilizados extratos obtidos por decocção, maceração e turbolização a partir do material vegetal em estudo (item 2.1.1).

2.2.15.1 Decocção (DE) (FARMACOPÉIA, 1959; OSOL, 1980)

Foram preparados decoctos segundo o processo geral da FARMACOPÉIA (1959).

Colocaram-se em erlenmeyer 5g da droga vegetal rasurada, adicionando 100ml de água destilada. Levou-se a ebulição por 15 minutos, esfriando-se a cerca de 40°C e filtrando-se através de algodão para balão volumétrico de 100ml.

Passou-se água destilada fervente sobre o resíduo do filtro, completando-se o volume (decocto total).

2.2.15.2 Maceração (MC)

Puseram-se a macerar 15g, exatamente pesados, de droga vegetal de granulometria 0,800-0,630mm e 0,400-0,315mm com 150ml de misturas hidroalcoólicas I e II (item 2.1.3), por períodos de 5 e 12 dias, em erlenmeyer provido de tampa de vidro esmerilhada, ao abrigo da luz e com agitação ocasional

(MACERATION, 1970; OSOL, 1980).

Após o período de tempo determinado, filtrou-se, e o resíduo foi prensado em prensa hidráulica manual, lavando-se com o mênstruo até completar o volume a 150ml, pesando-o em seguida (macerado total) (DÄRR, 1979).

2.2.15.3 Turbolização (ET)

Foram turbolizados 50g da matéria-prima vegetal moída com 500ml de mistura hidroalcoólica I, em recipiente fechado, por 20 minutos, à temperatura ambiente em velocidade 4. Tomou-se o devido cuidado, evitando-se que a temperatura durante o processo não ultrapassasse os 40°C, deixando-se resfriar em geladeira quando atingisse tal temperatura. Passado o tempo de extração, filtrou-se em funil de Büchner. O resíduo foi prensado em prensa hidráulica manual e o marco foi lavado com o mênstruo, completando-se o volume. O turbolizado total foi então pesado (turbolizado total) (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Na realização dos ensaios cromatográficos iniciais e na determinação do flavonol 3-0-metilquercetina, o extrato turbolizado (ET) obtido, foi reduzido em banho-maria a cerca de um quinto de seu volume inicial.

2.2.16 Purificação dos Extratos

Retiraram-se alíquotas de 20,0ml dos extratos totais (ET e MC) que foram evaporadas em banho-maria até resíduo. Este foi deixado em dessecador por 12 a 16 horas (RST). O RST foi pesado e após, tratado exaustivamente com 20ml de acetato de etila,

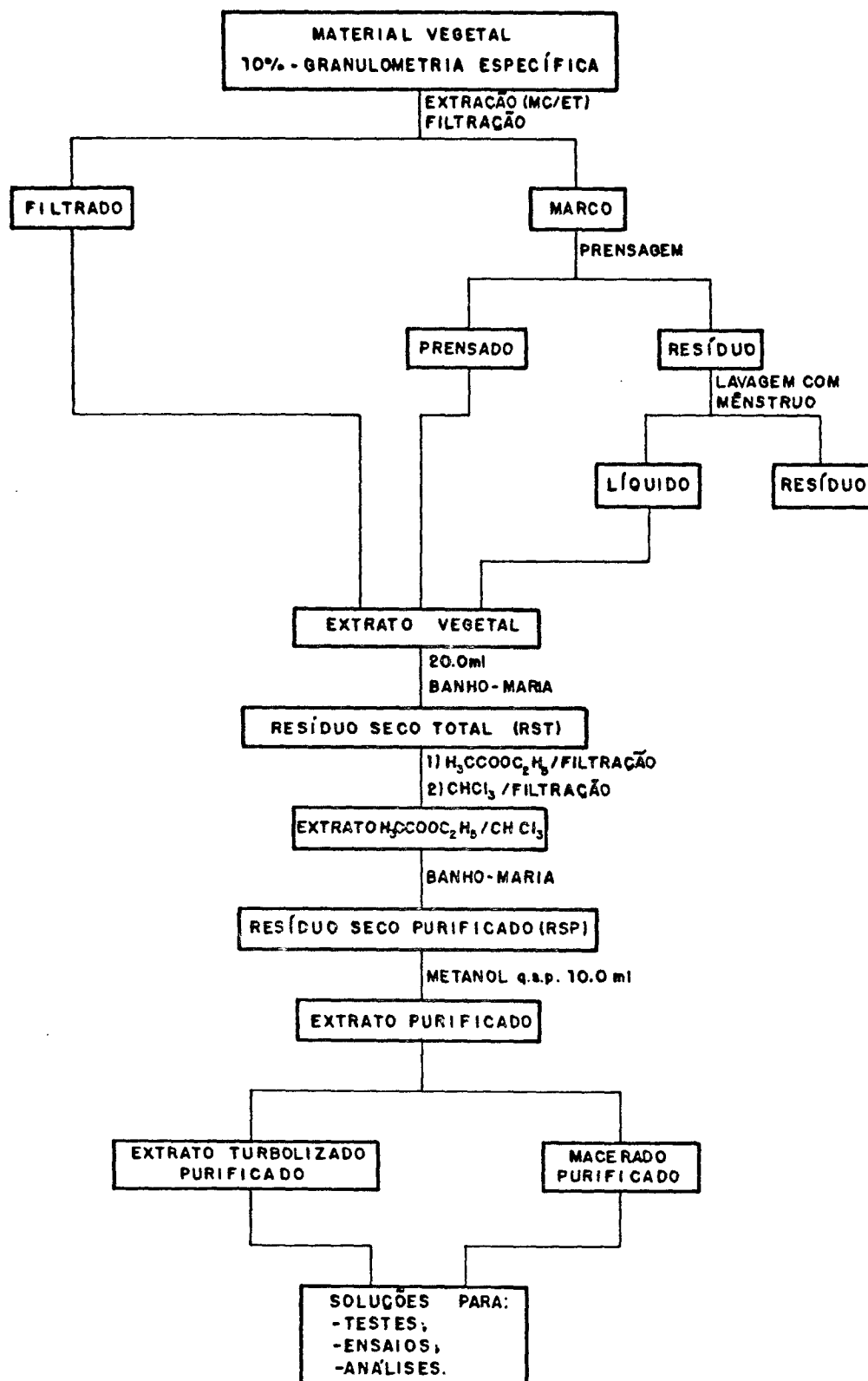


FIGURA 3 - Esquema de extração e purificação dos extratos.

filtrado e o filtro lavado com o próprio solvente. O RST como anteriormente, com 20ml de clorofórmio foi levado a seguir em banho-maria obtendo-se o resíduo seco purificado (RSP). Guardaram-se os RSP em dessecador por 24 a 36 horas, para depois serem pesados. Após a pesagem, os RSP foram tratados com cerca de 9ml de metanol, filtrados para balão volumétrico de 10ml, completando-se o volume com o solvente, obtendo-se assim extrato turbolizado purificado (ETP), macerados purificados (MCP) e decocto purificado (DEP) (Figura 3).

2.2.17 Análise Quantitativa

Foram utilizados dois métodos para o doseamento das substâncias referência (3MQ e EUP): a cromatografia em camada delgada associada a espectrometria no ultravioleta (CCD/UV) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para validação do método CCD/UV foi determinada a absorvância de soluções das substâncias referência (3MQ e EUP) diretamente por UV (método direto).

2.2.17.1 Preparo das soluções padrão

2.2.17.1.1 3-O-metilquercetina (3MQ)

Para utilização do método direto foi preparada solução metanólica de 3MQ nas concentrações de 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020mg/ml a partir de uma solução de 1mg/ml. Para o método CCD/UV foi empregada solução metanólica de 3MQ em concentração

de 1mg/ml.

Na CLAE foram empregadas soluções metanólicas de 3MQ com as seguintes concentrações: 0,05; 0,10; 0,20 e 0,40mg/ml, preparadas a partir de uma solução de 0,8mg/ml.

2.2.17.1.2 Eupatorina (EUP)

Para o método direto a partir de uma solução metanólica de EUP com concentração de 1mg/ml, prepararam-se soluções de 0,004; 0,008; 0,016 e 0,020mg/ml. Para o método CCD/UV foi empregada solução metanólica de EUP a 1mg/ml.

Para a CLAE foram preparadas soluções metanólicas de concentração 0,0512; 0,1280; 0,3200 e 0,8000mg/ml a partir de uma solução de EUP com concentração de 0,8mg/ml.

2.2.17.2 Método CCD/UV

Os extratos purificados (ETP e DEP) e as soluções padrão de 3MQ e EUP foram aplicados em forma de linha de 2,5cm de comprimento em cromatoplasas analíticas, com auxílio de microsseringa de 100 μ l de capacidade, nos volumes de 400 e 1200 μ l respectivamente, para o ETP e DEP.

Para a obtenção da curva padrão pelo método CCD/UV foram aplicados como descrito acima volumes de 25; 50; 75 e 100 μ l, a partir de uma solução de 1mg/ml de 3MQ e 20; 40; 60; 80 e 100 μ l, a partir da solução de 1mg/ml de EUP. Desenvolveram-se as mesmas utilizando-se o sistema cromatográfico I-7 (item 2.2.13.2) e após retirou-se a sílicagel nas zonas correspondentes à 3MQ e EUP, tanto para os padrões como para os

ETP e DEP, numa área de cerca de 2,5cm². Eluiu-se com metanol, em banho de água quente a 67°C por 2 horas. Filtrou-se através de filtros de politetrafluoretileno, porosidade 0,22µm (Millipore FHLPO1300), completou-se o volume em balão de 5,0ml com o mesmo solvente e procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV (EF) das soluções metanólicas a 358nm para a 3MQ e a 342nm para a EUP (VOIRIN, 1983).

Paralelamente, para a obtenção da curva padrão pelo método direto, determinou-se as absorvâncias das soluções metanólicas de 3MQ e EUP, como descrito em 2.2.17.1.1 e 2.2.17.1.2, nos mesmos comprimentos de onda.

As concentrações de 3MQ e EUP nos ETP e DEP foram calculadas a partir das equações da reta determinada pelas curvas padrão, através da equação (6)

$$C_s = \frac{(\text{Abs.} - a)}{b} \cdot f_d \quad (6)$$

onde:

C_s = concentração de 3MQ ou EUP nas amostras (%; m/V);

Abs. = absorvância da 3MQ ou EUP, respectivamente a 358 e 342nm, nas amostras;

a = intersecção da reta com o eixo y;

b = inclinação da reta, e

f_d = fator de diluição em relação à concentração de material vegetal = $625,0 \cdot (V_2/V_1)$, de tal modo que

V_1 = valor fixo de 0,4ml, e

V_2 = novo volume aplicado na cromatoplaça em ml.

Os resultados correspondem à média de três determinações.

Para validação do método CCD/UV foram analisados estatisticamente os valores das absorvâncias dos padrões.

2.2.17.3 Método CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

O doseamento pela CLAE foi realizado por comparação frente as áreas dos padrões externos de 3MQ e EUP, nas condições especificadas em 2.2.13.4. A área dos picos referentes a 3MQ e EUP (padrão e amostras) foram determinadas por integração ($\mu\text{V.s}$) e/ou triangulação (cm^2) e a concentração de 3MQ e EUP nas amostras calculada através da equação (7)

$$C_s = (C_p \cdot A_a/A_p) \cdot f_d \quad (7)$$

onde:

C_s = concentração da substância, 3MQ ou EUP, na amostra (%; m/V);

C_p = concentração do padrão externo respectivo (mg/ml);

A_a = área integrada do pico da substância 3MQ ou EUP na amostra ($\mu\text{V.s}$) ou por triangulação (cm^2);

A_p = área integrada do pico do padrão externo respectivo ($\mu\text{V.s}$) ou por triangulação (cm^2), e

f_d = fator de diluição das amostras em relação à concentração de material vegetal = 500, tanto para 3MQ como para EUP.

Os resultados correspondem à média de três determinações. Validou-se o método CLAE pela comparação entre as áreas dos picos dos padrões e pela obtenção das respectivas curvas padrão.

2.2.18 Análise Fatorial

2.2.18.1 Projeto fatorial

Com o objetivo de estudar a influência de determinados fatores sobre a qualidade de extratos de *Baccharis trimera* (Less.) DC., utilizou-se projeto fatorial do tipo 2^n , onde cada fator recebe dois níveis, denominados arbitrariamente de nível positivo e nível negativo, denotados, respectivamente, pelos sinais (+) e (-).

Escolheram-se 3 fatores a serem utilizados neste projeto, como segue:

Fator A: tempo de maceração (dias);

Fator B: teor etanólico do líquido extrativo (%; V/V);

Fator C: granulometria da matéria-prima vegetal (mm).

Fixou-se o percentual de planta a ser utilizada em 10% (m/V) em relação ao líquido extrator.

Para cada um dos três fatores, estabeleceram-se dois níveis (+) e (-), respectivamente, como sendo:

Fator A: 12 e 5 dias;

Fator B: 70 e 50%;

Fator C: 0,800-0,630 e 0,400-0,315mm.

Com essas informações, fez-se o planejamento para a realização dos experimentos como demonstra a Tabela 2.

A fim de fixar a seqüência de realização dos experimentos, foi feito o sorteio aleatório dos mesmos. Com isto evitaram-se erros sistemáticos (LIST & SCHMIDT, 1984).

TABELA 2 - Combinações dos fatores para realização dos experimentos.

EXPERIMENTO Nº	COMBINAÇÃO	A	B	C
1	(1)	-	-	-
2	a	+	-	-
3	b	-	+	-
4	c	-	-	+
5	ab	+	+	-
6	ac	+	-	+
7	bc	-	+	+
8	abc	+	+	+

2.2.18.2 Avaliação do projeto fatorial

Para a avaliação dos efeitos dos fatores foram empregados os seguintes parâmetros nos macerados:

- Valor do pH: como descrito em 2.2.4.

Os resultados correspondem a média de três determinações.

- Teor alcoólico: como descrito em 2.2.7.2, sendo que os resultados correspondem a média de três determinações.

- Resíduo seco: como descrito em 2.2.6. Os resultados foram calculados com relação a 150g do extrato, sendo representada a média de três determinações.

- Resíduo seco purificado: segundo a técnica apresentada em 2.2.16. Para a obtenção da média de três análises, o valor foi calculado a partir de 150g do extrato.

- Quantificação de 3MQ e EUP por CLAE: com os macera-

dos (MC) filtrados, procedeu-se a purificação como descrito em 2.2.16, obtendo-se os MCP. A determinação quantitativa seguiu a metodologia preconizada em 2.2.17.3. Cada valor representa a média de três determinações por MCP.

O cálculo dos efeitos e de um ou mais fatores sobre cada parâmetro do macerado foi realizado empregando-se a forma padrão do projeto fatorial (Tabela 3) e considerando-se que: o efeito de um fator sobre a característica resulta da diferença da média aritmética entre os tratamentos com nível superior e nível inferior deste fator (equações 8, 9 e 10).

As interações (efeitos de fatores) duplas são calculadas através da metade da diferença entre o efeito do primeiro fator no nível superior do segundo fator e o efeito do primeiro fator no nível inferior do segundo fator (equações 11, 12 e 13).

As interações triplas calculam-se como a metade da diferença entre a interação dos primeiros dois fatores com o terceiro fator nos níveis superior e inferior (equação 14) (SUCKER et alii, 1978; LIST & SCHMIDT, 1984).

Para o experimento do tipo 2^3 utilizaram-se as seguintes equações:

1. Efeito de A (E_A):

$$E_A = 1/4(y_2 + y_4 + y_6 + y_8) - 1/4(y_1 + y_3 + y_5 + y_7) \quad (8)$$

2. Efeito de B (E_B):

$$E_B = 1/4(y_3 + y_4 + y_7 + y_8) - 1/4(y_1 + y_2 + y_5 + y_6) \quad (9)$$

3. Efeito de C (E_C):

$$E_C = 1/4(y_5 + y_6 + y_7 + y_8) - 1/4(y_1 + y_2 + y_3 + y_4) \quad (10)$$

4. Interação entre os fatores A e B (I_{AB}):

$$I_{AB} = 1/8[(y_1+y_4+y_5+y_8) - (y_2+y_3+y_6+y_7)] \quad (11)$$

5. Interação entre os fatores A e C (I_{AC}):

$$I_{AC} = 1/8[(y_1+y_3+y_6+y_8) - (y_2+y_4+y_5+y_7)] \quad (12)$$

6. Interação entre os fatores B e C (I_{BC}):

$$I_{BC} = 1/8[(y_1+y_2+y_7+y_8) - (y_3+y_4+y_5+y_6)] \quad (13)$$

7. Interação entre os fatores A, B e C (I_{ABC}):

$$I_{ABC} = 1/8[(y_2+y_3+y_5+y_8) - (y_1+y_4+y_6+y_7)]. \quad (14)$$

2.2.18.3 Análise da variância do projeto fatorial

Para a avaliação estatística, foram utilizados os valores das áreas dos picos de 3MQ e EUP obtidos na quantificação por CLAE, fazendo-se o estudo por substância.

Foi empregado na análise da variância o teste F, seguido dos métodos de YATES e de TUKEY (método T) (GUPTA & MATHAI, 1980).

Com base nos dados da Tabela 2, pôde-se obter de maneira sistemática a Tabela 3, apresentando os efeitos principais e interações de um experimento 2^3 , usualmente chamado de projeto matriz.

A partir da Tabela 3, procedeu-se aos cálculos para os contrastes dos efeitos obtendo-se a soma dos quadrados (SQ) e o quadrado médio (QM), chegando-se ao valor de F, a ser comparado com o valor de F tabelar.

Para o teste F, utilizou-se do programa STATITCF de

TABELA 3 - Forma padrão para avaliação dos efeitos principais e interações em um projeto fatorial 2^3 .

TRATAMENTOS	EFEITOS			INTERAÇÕES				RESULTADO EXPERIMENTO
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
(1)	-	-	-	+	+	+	-	Y_1
a	+	-	-	-	-	+	+	Y_2
b	-	+	-	-	+	-	+	Y_3
ab	+	+	-	+	-	-	-	Y_4
c	-	-	+	+	-	-	+	Y_5
ac	+	-	+	-	+	-	-	Y_6
bc	-	+	+	-	-	+	-	Y_7
abc	+	+	+	+	+	+	+	Y_8

análise de variância; este mostra, além do teste F, os resíduos suspeitos (método de GRUBBS) (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 1980).

Partindo-se da somatória dos valores das áreas de 3MQ e EUP, obteve-se seguindo o método de YATES (GUPTA & MATHAI, 1980) os valores estimados (\hat{Y}) de cada efeito para cada um dos tratamentos, empregando-se a equação (15), cujos elementos foram extraídos da Tabela 4.

TABELA 4 - Método de YATES para os cálculos dos efeitos principais e suas interações.

TRATAMENTO	A_1	A_2	A_{12}
1	$a + 1 = K$	$L + K = X$	$Y + X$
a	$ab + b = L$	$N + M = Y$	$W + Z$
b	$ac + c = M$	$P + O = Z$	$G + F$
ab	$abc + bc = N$	$R + Q = W$	$I + H$
c	$a - 1 = O$	$L - K = F$	$Y - X$
ac	$ab - b = P$	$N - M = G$	$W - Z$
bc	$ac - c = Q$	$P - O = H$	$G - F$
abc	$abc - bc = R$	$R - Q = I$	$I - H$

$$\hat{\Psi} = \Sigma A_{12}/t.2(3-1) \quad (15)$$

onde:

ΣA_{12} = somatório da coluna A_{12} ;

t = número de repetições no experimento.

Em seguida a obtenção dos valores estimados ($\hat{\Psi}$), aplicou-se o método T, calculando $\hat{\Psi}_n$ onde $n = \hat{l} - \hat{a}$; $\hat{l} - \hat{b}$; ...; $\hat{bc} - \hat{abc}$, não esquecendo que

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm \frac{1}{\sqrt{\ell}} \cdot q_{r,n-r;\alpha} \cdot \sqrt{MSE} \quad (16)$$

onde:

$\sqrt{\ell} = n_i$ onde i é o número de repetições;

$q_{r,n-r;\alpha}$ = valor da tabela onde:

r = número de níveis empregados;

n = número de macerados, e

α = nível de significância (0,05);

$\sqrt{MSE} = \sqrt{QM \text{ dos resíduos do teste } F}$.

Após feitos os cálculos, analisaram-se os resultados apresentados, independentemente, sempre entre dois efeitos estimados, seja para os efeitos principais (A, B e C) ou para suas interações de 1ª e 2ª ordem.

2.2.19 Cálculos Estatísticos

Para a análise dos pares de variáveis entre as quais supunha-se haver dependência linear, foram calculados os coeficientes de regressão linear e a correlação linear de Pearson (r), testando-se as hipóteses através da distribuição t de Student.

A comparação entre as médias de amostras independentes foi feita utilizando-se igualmente a distribuição t .

Os cálculos referentes à regressão linear, correlação linear de Pearson (r) e teste de 't', tanto para a correlação como para a diferença entre as médias de duas amostras independentes foram elaborados utilizando-se programas, montados em linguagem BASIC, desenvolvidos para microcomputador PC-1211 - RP da Sharp (Figura 4).

Para utilização a máquina deve estar em modo de operação 'DEF' com todas as memórias disponíveis. Os dois programas prevêm um máximo de 18 elementos em cada amostra, quando ambos estão na memória.

Para a utilização do programa A, de regressão linear, deve-se pressionar as teclas 'SHFT' e 'A' e esperar pelas solicitações que o próprio programa fará ao operador. A entrada de cada um dos dados deverá consistir da digitação do valor solicitado seguido da pressão da tecla 'ENTER'. Os pares de

dados (x; y) da regressão linear são incluídos da seguinte maneira: entra-se com valor de 'x', espera-se o sinal '?' para daí entrar com o valor de 'y'.

Para utilização do programa de teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (programa B), pressionam-se as teclas 'SHFT' e 'B' e espera-se pelas solicitações do programa.

A forma de entrada de dados é análoga a do programa de regressão (programa A).

Os programas cessam ao apresentarem algum resultado, esperando que o operador pressione a tecla 'ENTER' para continuar o processamento.


```

PROGRAMA A
5: "A": PAUSE "REGRESSÃO
  LINEAR"
10: INPUT "TAMANHO DA AMOS-
  TRA=?";C
20: FOR A=19TO C+18
22: B=A+C
24: PAUSE "INDICE=", A-18
25: INPUT "X,Y="; A(A), A(B)
30: D=D+A(A)
40: E=E+A(B)
50: F=F+A(A)*A(A)
60: G=G+A(B)*A(B)
70: H=H+A(A)*A(B)
80: NEXT A
85: PRINT "FIM ARQUIVO: TE-
  CLA ENTER"
86: I=D/C
87: J=E/C
90: K=F-D2/C
100: L=H-D*E/C
110: M=G-E2/C
120: N=L/C
125: O=L/√(K*M)
130: P=L/K
140: Q=J-P*I
150: PRINT "CORR R, Y=AX+B:
  T ENTER"
160: PRINT "R=", O:PRINT "A=",
  P:PRINT "B=", Q
165: IF Q=1GOTO 185
170: R=ABS(O)/√((1-O*O)/(C-2))
173: IF R>999.999 GOTO 185
175: USING "###.###"
180: PRINT "T CALC DE R="; R
183: GOTO 190
185: PRINT "T CALC MAIOR QUE
  999.999"
190: END

PROGRAMA B
195: "B": PAUSE "TESTE DE
  DIF DE MEDIAS"
200: INPUT "TAM AM A="; A
210: FOR K=19TO 18+A
213: PAUSE "INDICE=", K-18
215: INPUT "X DA AMOSTRA
  A="; A(K)
220: C=C+A(K)
230: E=E+A(K)2
240: NEXT K
250: PRINT "FIM AM A-ENTER"
260: INPUT "TAM AM B="; B
270: FOR L=A+19TO 18+A+B
275: PAUSE "INDICE=", L-(
  18-A)
280: INPUT "X DA AMOSTRA
  B=";A(L)
290: D=D+A(L)
300: F=F+A(L)2
305: NEXT L
310: PRINT "FIM AM B-ENTER"
320: I=E-C2/A
330: J=F-D2/B
340: M=(I+J)/(A+B-2)
350: G=C/A
360: H=D/B
370: N=ABS(G-H)/√(M/A+M/B)
373: O=√((E-C*C/A)/(A-1))
375: P=√((F-D*D/B)/(B-1))
380: PRINT "MEDIA AM A="; G
383: USING "###.###"
385: PRINT "DESV PAD A="; O
390: PRINT "MEDIA AM B="; H
391: USING "###.###"
392: PRINT "DESV PAD B="; P
393: IF N>999.999 GOTO 405
395: USING "###.###"
400: PRINT "TESTE: T CALC="; N
403: GOTO 410
405: PRINT "T CALC MAIOR QUE
  999.999"
410: END

```

FIGURA 4 - Programa para cálculo dos coeficientes de regressão linear simples, correlação linear de Pearson (r) e teste 't' para r (programa A) e cálculo do valor de 't' referente ao teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (programa B).

3 - RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

3.1.1 Análise Botânica

Baccharis trimera (Less.) A. P. de Candolle é um subarbusto de aproximadamente 50cm de altura, podendo ser maior dependendo do local onde se encontra.

Possui ramos triplados com alas membranosas, verde-brilhantes, folhas atrofiadas e capítulos dispostos em inflorescências sésseis ou quase sésseis aglomerados em ramificações de primeiro grau, formando espigas interrompidas, nas terminações dos ramos.

O involúcro da inflorescência é campanulado ou oblongo, em regra com 6mm de altura e 4-5mm de diâmetro. As brácteas involucrais são acuminadas.

O gênero *Baccharis* distingue-se dos demais da tribo *Astereae* por apresentar plantas dióicas.

3.1.2 Perda por Dessecação

O vegetal fresco teve uma perda por dessecação de $33,24 \pm 0,97$ (2,92%).

TABELA 5 - Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em função do tempo de armazenamento.

TEMPO DE ARMAZENAMENTO (MESES)	n	PERDA POR DESSECAÇÃO % (m/m) \pm s	CV%
0	3	5,75 \pm 0,06	1,04
5	6	17,25 \pm 0,22	1,28
9	6	10,50 \pm 0,19	1,80
20	6	10,44 \pm 0,12	1,11

3.1.3 Perda por Secagem

TABELA 6 - Perda por secagem da matéria-prima vegetal.

MASSA DO VEGETAL FRESCA (g)	MASSA DO VEGETAL APÓS 9 DIAS DE SECAGEM A 32,5°C (g)	PERDA POR SECAGEM (%; m/m)
5.600,0	1.432,0	25,57

3.1.4 Teor de Extrativo

O teor de extrativo da matéria-prima vegetal, com 15 dias de armazenamento, foi calculado a partir da equação (3) (2.2.8), onde obtiveram-se 0,0521g de resíduo seco a partir de 1,0000g da droga vegetal, resultando 26,05% (m/m).

3.1.5 Teor de Flavonóides Totais

Determinou-se o teor de flavonóides totais como quercetina, através da equação (4), como descrito em 2.2.9, partindo-se dos seguintes dados: Abs. = 0,203; e = 0,400g; t = 10,44% (m/m).

A concentração de flavonóides, em quercetina, corresponde a 0,71% (m/m) \pm 0,021 (10,11%).

3.1.6 Teor de Óleo Essencial

O vegetal fresco apresentou 1,04ml de óleo essencial em 100g, resultando um teor de 1,56% (m/V) com relação a droga dessecada.

TABELA 7 - Percentagem de óleo essencial da matéria-prima vegetal em relação ao tempo de armazenamento.

TEMPO DE ARMAZENAMENTO (MESES)	VOLUME DE ÓLEO ESSENCIAL EM 100g DE VEGETAL (ml)	VOLUME DE ÓLEO ESSENCIAL EM RELAÇÃO A DROGA DESSECADA (%; V/m)
0	3,70	3,93
5	0,57	0,69
9	0,61	0,68
20	0,36	0,40

3.1.7 Teste de Saponinas

De acordo com a metodologia (2.2.11) resultou a formação de espuma com 1,2cm de altura, persistindo por 10 minutos e não desaparecendo com a adição de HCl 2N (Positivo).

3.1.8 Análise Granulométrica (AG)

TABELA 8 - Análise granulométrica por tamisação de *Baccharis trimera* (Less.) DC. rasurada.

m (mm)	CG (mm) (Mmín-Mmáx)	Δm (mm)	\bar{m} (mm)	F (%)	R (%)	P (%)
2,000	2,000 — 3,000	1,000	2,5000	5,24	5,24	94,76
1,600	1,600 — 2,000	0,400	1,8000	4,82	10,06	89,94
1,250	1,250 — 1,600	0,350	1,4250	7,91	17,97	82,03
1,000	1,000 — 1,250	0,250	1,1250	8,90	26,87	73,13
0,800	0,800 — 1,000	0,200	0,9000	9,64	36,51	63,49
0,630	0,630 — 0,800	0,170	0,7150	14,06	50,57	49,43
0,400	0,400 — 0,630	0,230	0,5150	18,08	68,65	31,35
0,315	0,315 — 0,400	0,085	0,3575	7,96	76,61	23,39
0,200	0,200 — 0,315	0,115	0,2575	10,36	86,97	13,03
COLETOR	0 — 0,200	0,200	0,1000	13,03	100,00	0,00

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO DECOCTO (DE) E DO EXTRATO TURBOLIZADO (ET)

3.2.1 Determinação do Índice de Amargor (IA)

TABELA 9 - Títulos das diluições de brucina, turbolizado (ET) e decocto (DE) (V/V) e respectivos índices de amargor (IA) para os extratos.

n	DILUIÇÃO			IA	
	BRUCINA	ET	DE	ET	DE
3	3.200.000	1375 \pm 750 (183,00%)	1000 \pm 0,00	43,0	31,3

3.2.2 Determinação do Índice de Espuma (IE)

TABELA 10 - Índice de espuma (IE) para o decocto (DE) e turbolizado (ET) (n = 3).

IE DE	IE ET
141 ± 70,44 (50,07%)	< 100

3.2.3 Valor do pH

TABELA 11 - Valores de pH para os extratos decocto (DE), turbolizado (ET) e para os solventes (n = 3).

ÁGUA	ETANOL	DE	ET
6,07 ± 0,00		5,12±0,006(0,12%)	
6,73±0,11(1,63%)	7,60±0,00		6,02±0,12(1,99%)

3.2.4 Determinação do Resíduo Seco

TABELA 12 - Resíduo seco para o decocto (DE) e extrato turbolizado (ET) (n = 3), calculado a partir da equação (3) (2.2.8).

EXTRATO	PESO DO EXTRATO UTILIZADO (g)	RESÍDUO (g) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	RESÍDUO SECO (%; m/m)
DE	20,0000	0,0281 ± 0,0031 (1,10)	14,05
ET	20,3824	0,0599 ± 0,0074 (1,23)	29,95

3.2.5 Determinação do Teor Alcoólico para o Extrato Turbolizado (ET)

3.2.5.1 Pelo método do picnômetro (DÄRR, 1979)










De acordo com o item 2.2.7.1, a densidade obtida foi de 0,9786 que corresponde a 32% de etanol em volume a 15,56°C.

3.2.5.2 Pelo método do areômetro

Obteve-se diretamente no ET densidade de 0,974 que corresponde a 40% de etanol em volume a 15,56°C.

3.2.6 Análise Cromatográfica (AC)

Para todas as cromatografias em papel e em camada delgada, utilizou-se da seguinte representação características das manchas cromatográficas:

	BRANCO		AMARELO CLARO
	AZUL		LUZ VISÍVEL: AMARELO CLARO NH ₃ /LUZ UV254nm: AMARELO FORTE
	VERDE		LUZ VISÍVEL: AMARELO CLARO LUZ UV 366nm: ESCURA NH ₃ /LUZ UV254nm: AMARELO BRILHANTE
	MARROM		LUZ UV 366nm: ESCURA NH ₃ /LUZ UV 366nm: ESCURA OU FRACAMENTE AMARELADA
	VERMELHO		

3.2.6.1 Decocto (DE)

3.2.6.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) do decocto purificado (DEP)

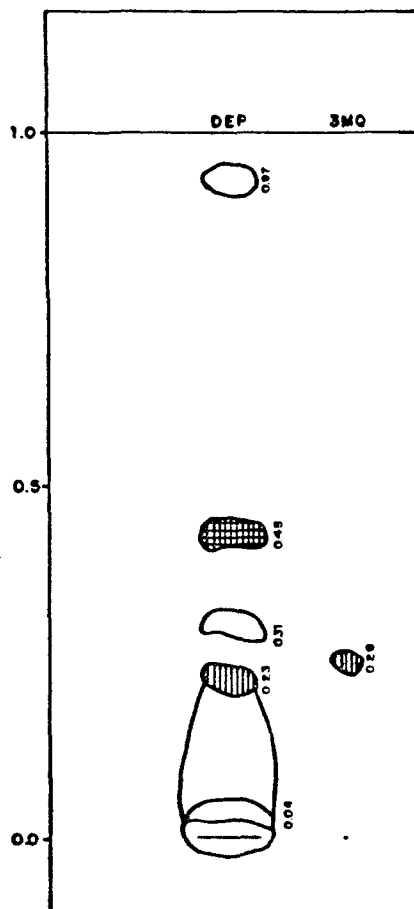


FIGURA 5 - Cromatografia em camada delgada do decocto purificado (DEP) e de 3-0-metilquercetina (3MQ) utilizando o sistema eluente I-8 do item 2.2.13.2.

3.2.6.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do decocto purificado (DEP)

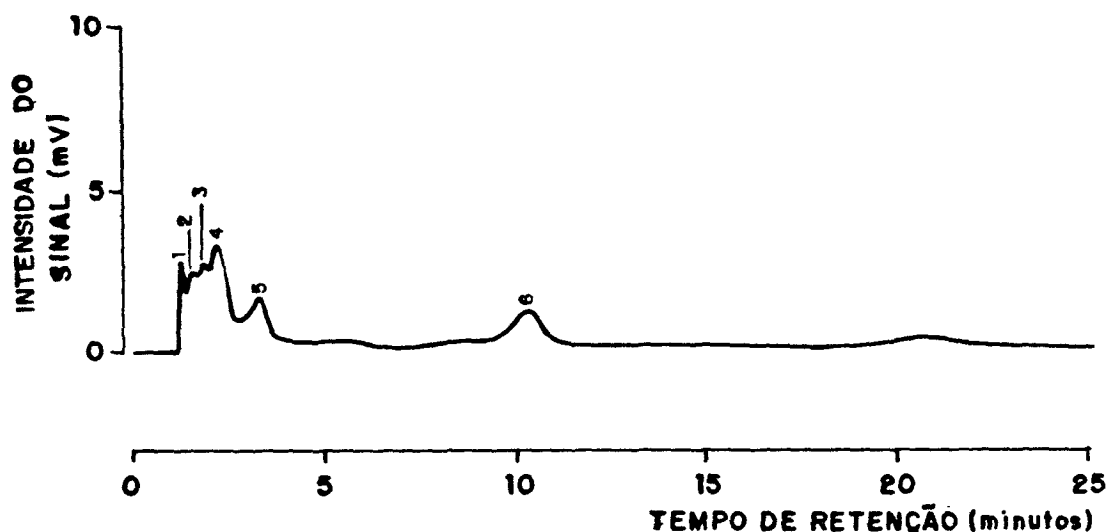


FIGURA 6 - Cromatograma (CLAE) do decocto purificado (DEP) (volume inicial de 40ml) nas condições pré-estabelecidas em 2.2.13.4 (fase móvel: metanol: ácido fosfórico a 1% (V/V) (40: 60; V/V); fluxo: 2,0ml/minuto; detecção:342nm).

TABELA 13 - Tempo de retenção (TR), largura da base (W), área sob a curva (A) e fator de resolução (Ri) entre os picos 5 e 6 do DEP.

PICO	TR (cm)	W (cm)	A (cm ²)	Ri
5	1,65	0,65	0,22	-
6	5,29	1,00	0,30	4,41

3.2.6.2 Extrato turbolizado (ET)

Após a purificação dos extratos (Figura 3), procedeu-se a análise cromatográfica, com o extrato turbolizado (ET), verificando-se a eliminação de diversas substâncias presentes no extrato total.

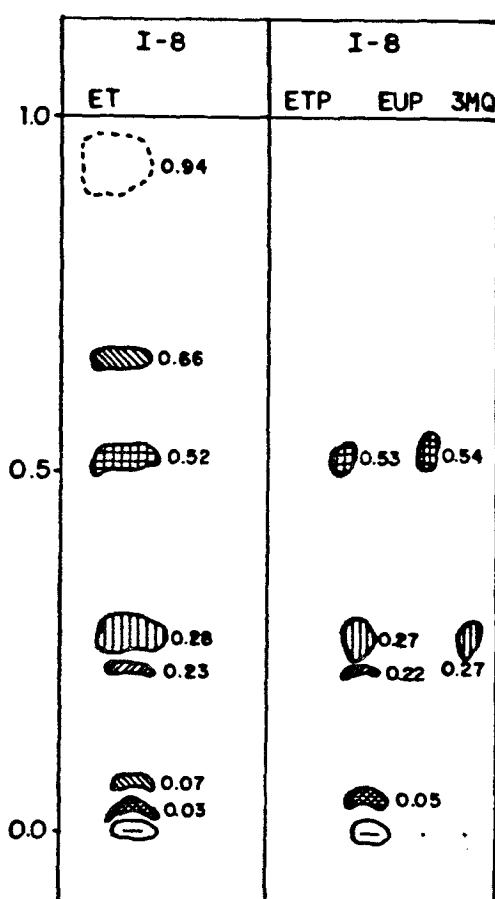


FIGURA 7 - Cromatogramas do extrato turbolizado (ET), turbolizado purificado (ETP) e das substâncias referência 3-O-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP).

3.2.6.2.1 Cromatografia em papel (CP)

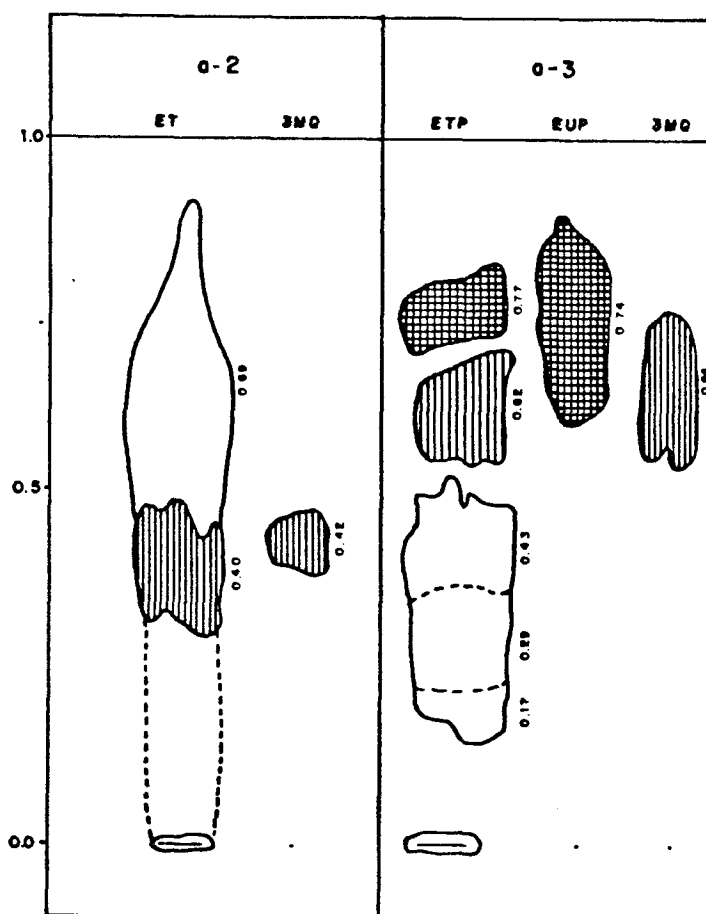


FIGURA 8 - Cromatogramas em papel do extrato turbolizado (ET), extrato turbolizado purificado (ETP), 3-0-metilquerce-tina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos sistemas a-2 e a-3 descritos no item 2.2.13.1.

3.2.6.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

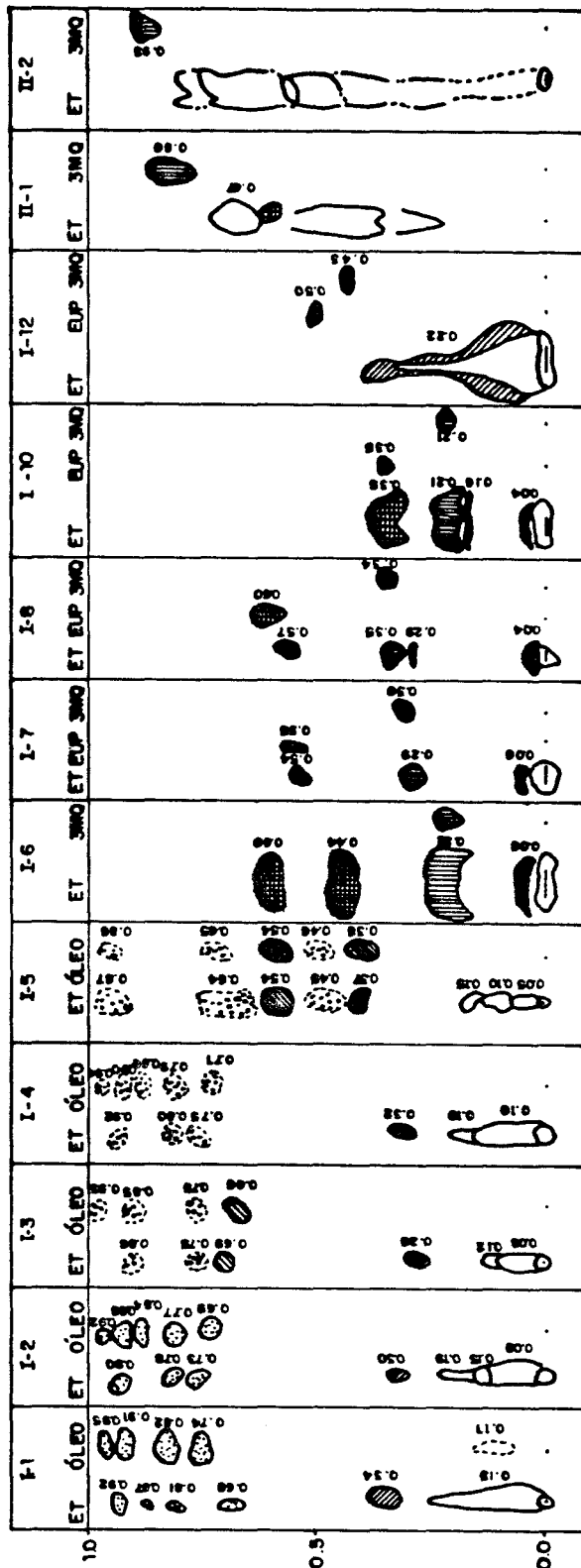


FIGURA 9 - Cromatogramas do extrato turbolizado (ET) nos sistemas cromatográficos descritos em 2.2.13.2.

3.2.6.2.3 Cromatografia líquida a vácuo (CLV)

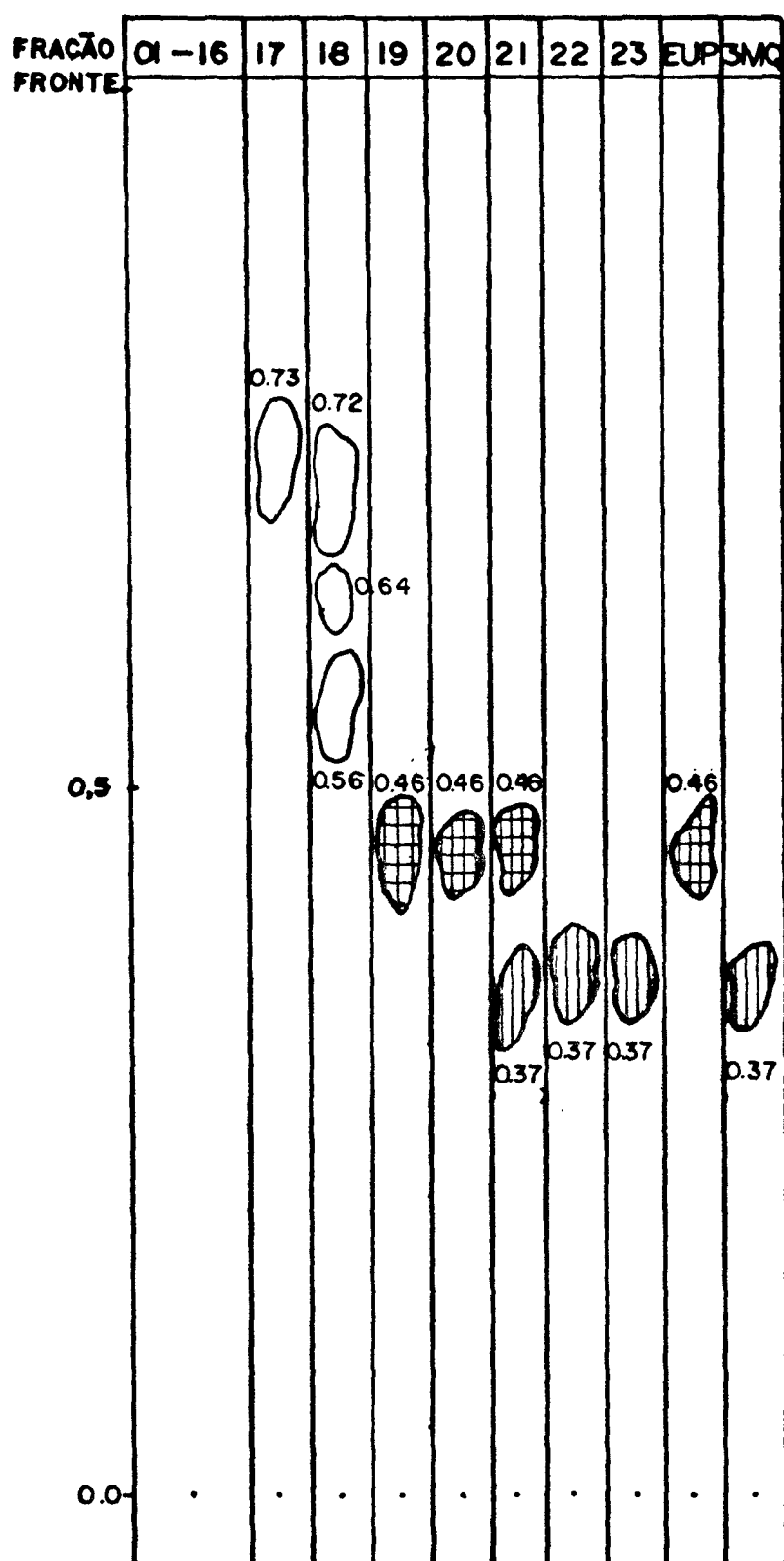


FIGURA 10 - Cromatograma das frações do extrato turbolizado (ET) obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizando o sistema cromatográfico I-9 (2.2.13.2).

3.2.6.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

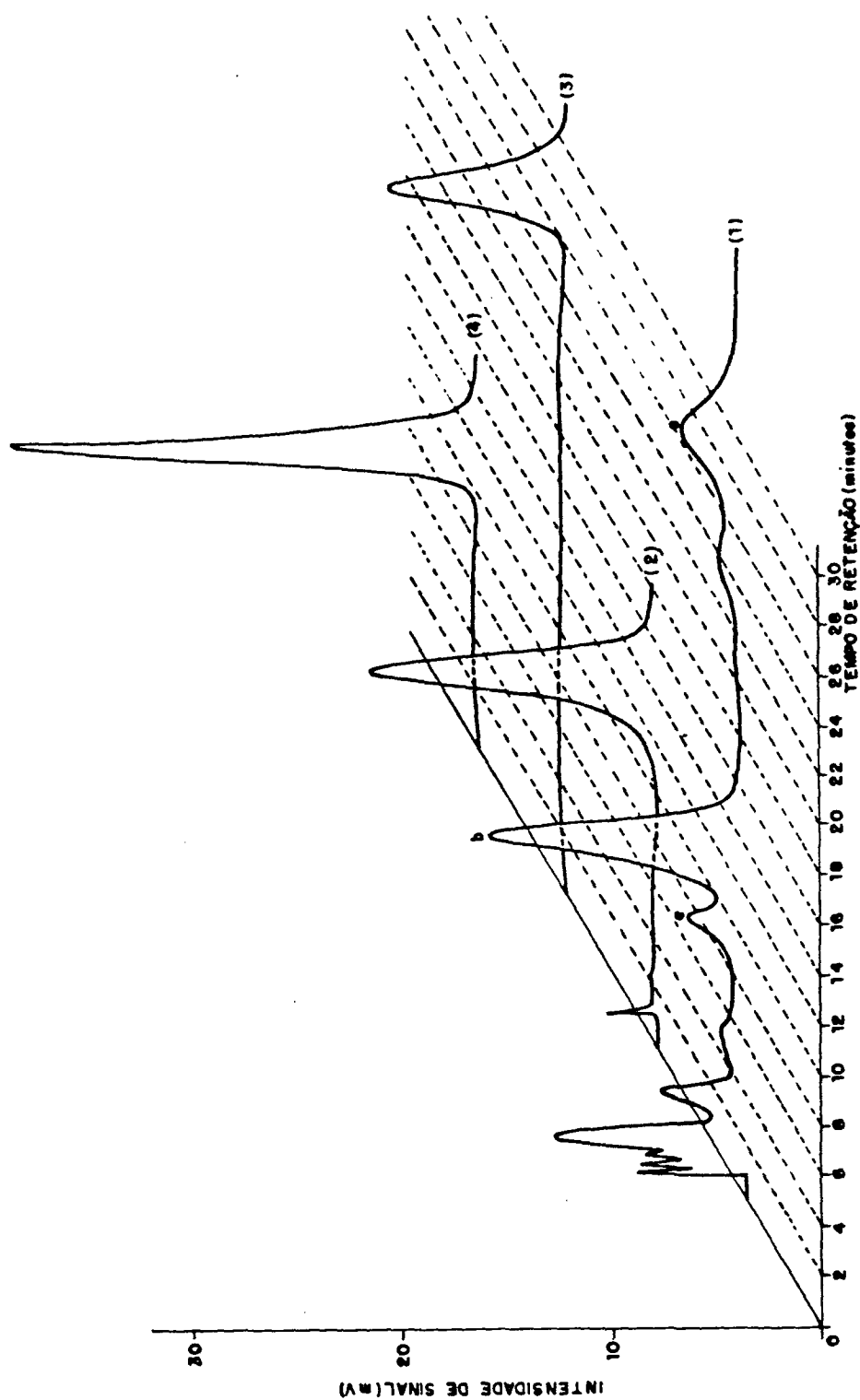


FIGURA 11 - CLAE do extrato turbolizado purificado (1), da 3-0-metilquercetina (2), eupatorina (3) e quercetina (4).

TABELA 14 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W), fator de resolução (Ri) e área dos picos (A) do extrato turbolizado (ET) e das substâncias referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) analisadas por CLAE em relação à quercetina (Q).

SUBSTÂNCIA/ PICO	TR (cm)	W (cm)	A (cm ²)	Ri
Q	5,8	1,21	6,17	-
3MQ	7,3	1,39	4,38	1,15
EUP	15,5	1,45	2,86	7,29
ETa	5,6	1,32	0,78	-
ETb	7,1	1,50	4,20	1,06
ETc	15,3	2,80	1,74	4,71

3.3 DETERMINAÇÃO DA SUBSTÂNCIA T

3.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

TABELA 15 - Comparação do comportamento espectroscópico no UV da substância T e da 3-0-metilquercetina.

SOLVENTES E REATIVOS	SUBSTÂNCIA T				3-0-METILQUERCETINA			
	MÁXIMOS (nm)							
	BANDA I		BANDA II		BANDA I		BANDA II	
METANOL (1)	357,	294sh	266sh,	253	358,	294sh	296sh,	257
METANOL + METÓXIDO DE SÓDIO (3)	404,	330	272		407,	329	272	
METANOL + CLORETO DE ALUMÍNIO (4)	438,	327 304sh	273		443,	336 303sh	277	
METANOL + CLORETO DE ALUMÍNIO + ÁCIDO CLO- RÍDRICO (5)	1a 403	1b 362, 298sh	277sh,	267	1a 402	1b 360, 299sh	277sh,	268
METANOL + ACETATO DE SÓDIO (6)	381,	318 298sh	270		383,	323	273	
METANOL + ACETATO DE SÓDIO + ÁCIDO BÓRICO (7)	377,	300sh	258		378,	298sh	262	

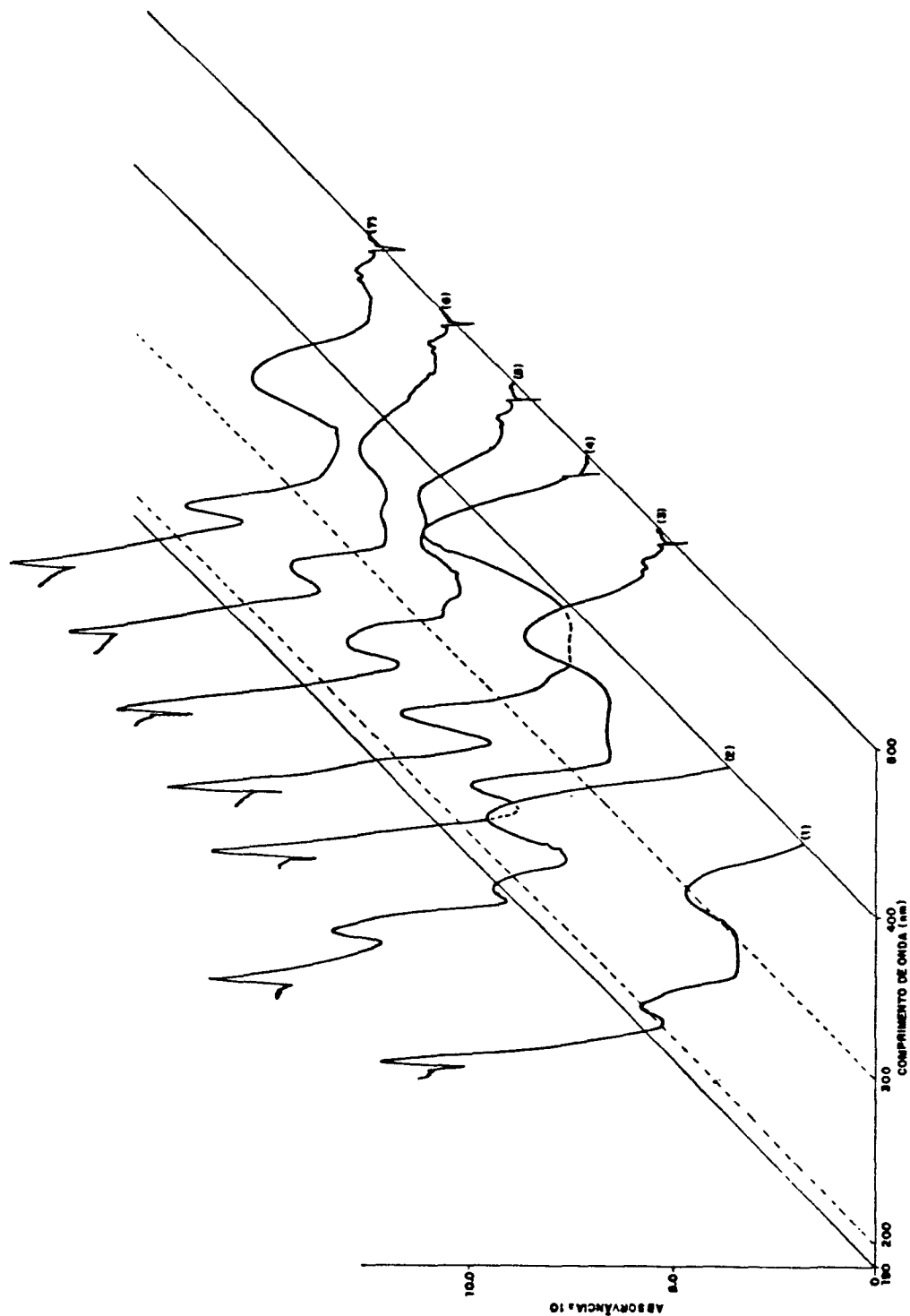


FIGURA 12 - Espectro no UV da substância T (ST) em solução metanólica e espectros com adição de reativos de ionização e/ou quelação. (1) H_3COH ; (3) $\text{H}_3\text{COH} + \text{H}_3\text{CONa}$; (4) $\text{H}_3\text{COH} + \text{AlCl}_3$; (5) $\text{H}_3\text{COH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}$; (6) $\text{H}_3\text{COH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$; (7) $\text{H}_3\text{COH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$ e da 3-O-metilquercetina padrão (2).

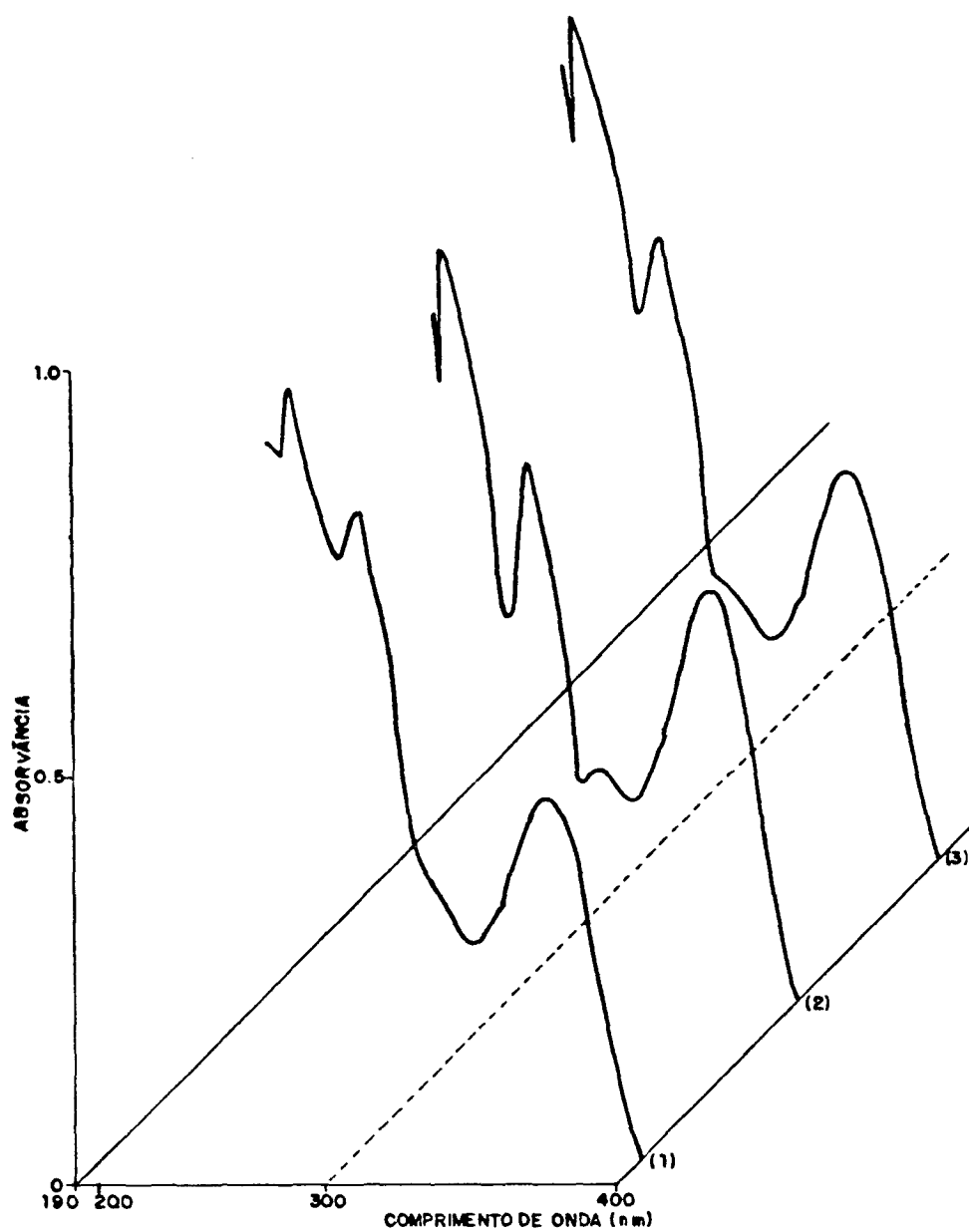


FIGURA 13 - Espectroscopia no UV da substância T (1), 3-O-me-
tilquercetina padrão (2) e da sua mistura (3).

3.3.2 Cromatografia em Papel (CP)

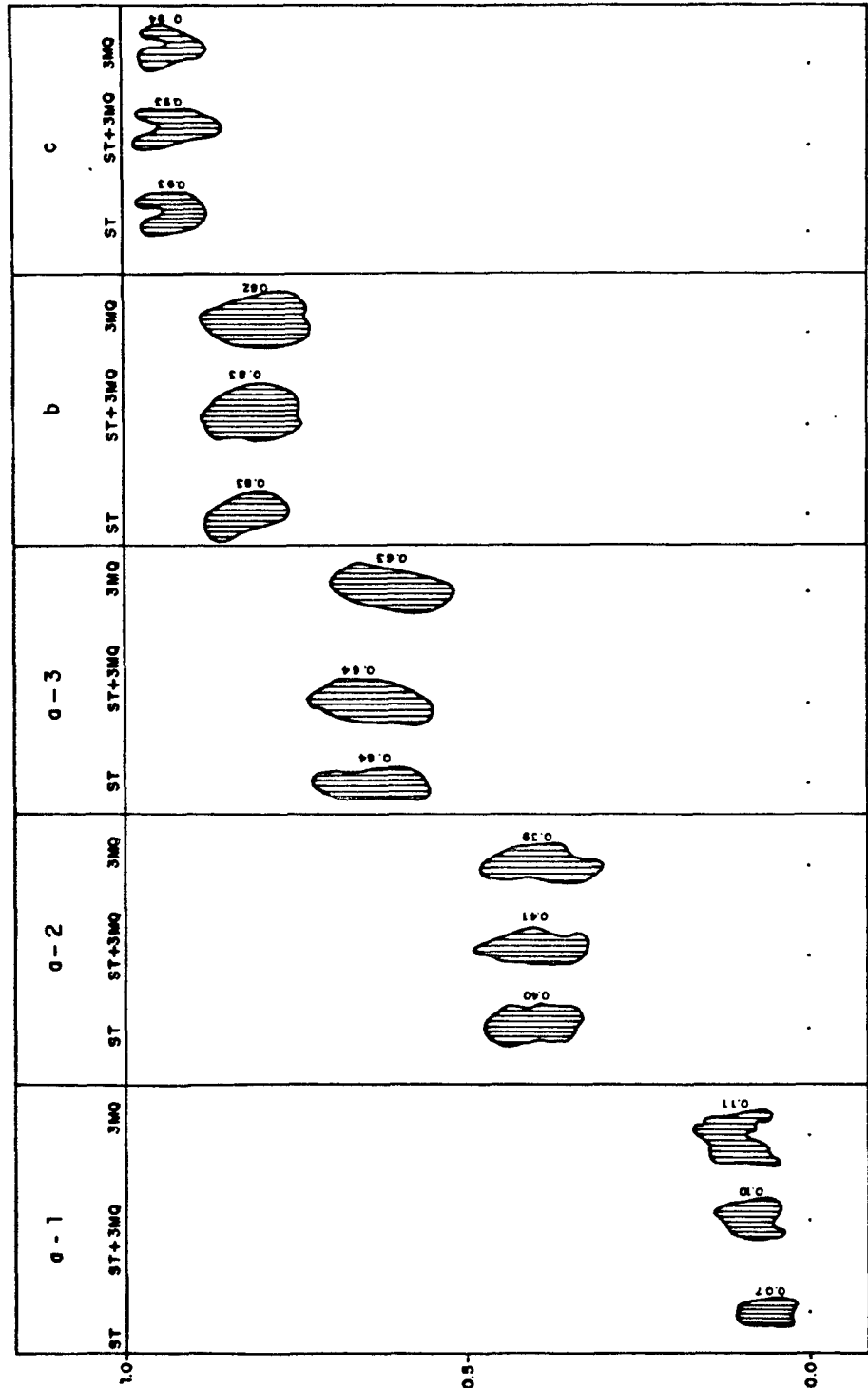


FIGURA 14 - Cocromatografia em papel da substância T (ST) com 3-O-metilquercetina (3MQ) nos sistemas cromatográficos do item 2.2.13.1.

3.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

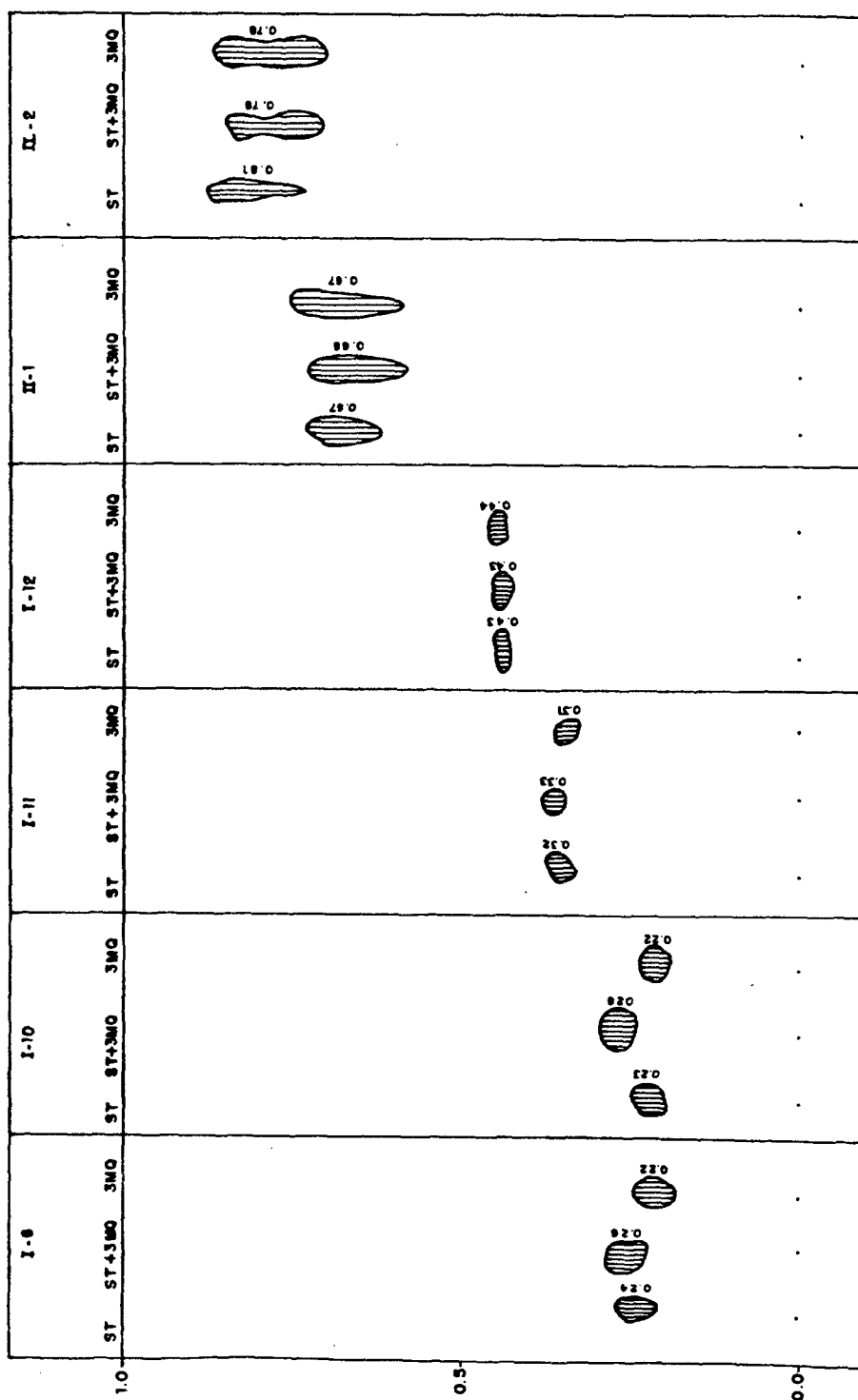


FIGURA 15 - Cromatogramas de camada delgada em diversos sistemas (I-6; I-10; I-11; I-12; II-1 e II-2), da substância T (ST), 3-O-metilquercetina (3MQ) e da mistura das substâncias (ST + 3MQ).

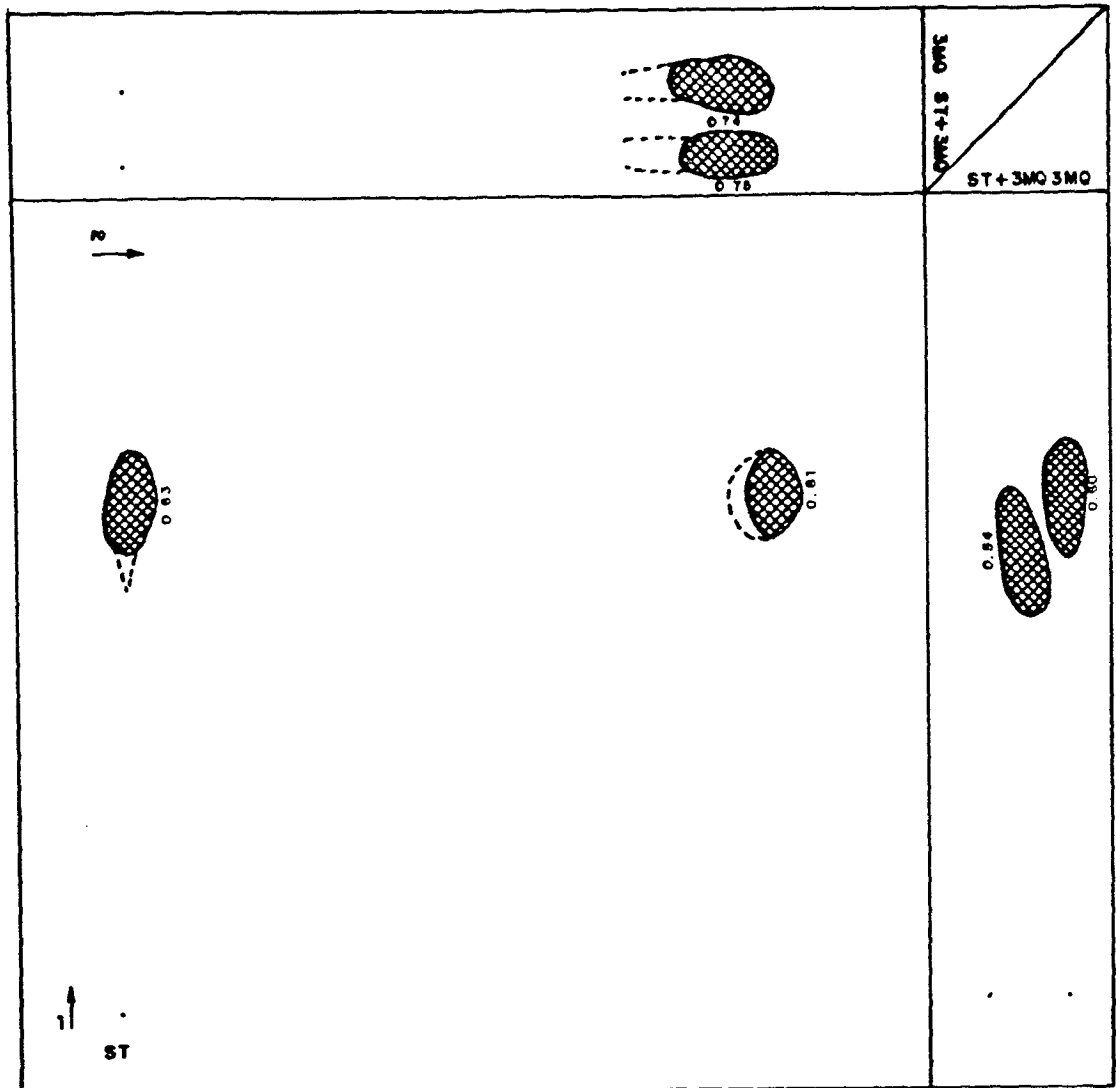


FIGURA 16 - Cromatografia bidimensional da substância T (ST), 3-O-metilquercetina (3MQ) e da mistura ST + 3MQ nos sistemas II-3-1 (sentido 1) e II-3-2 (sentido 2).

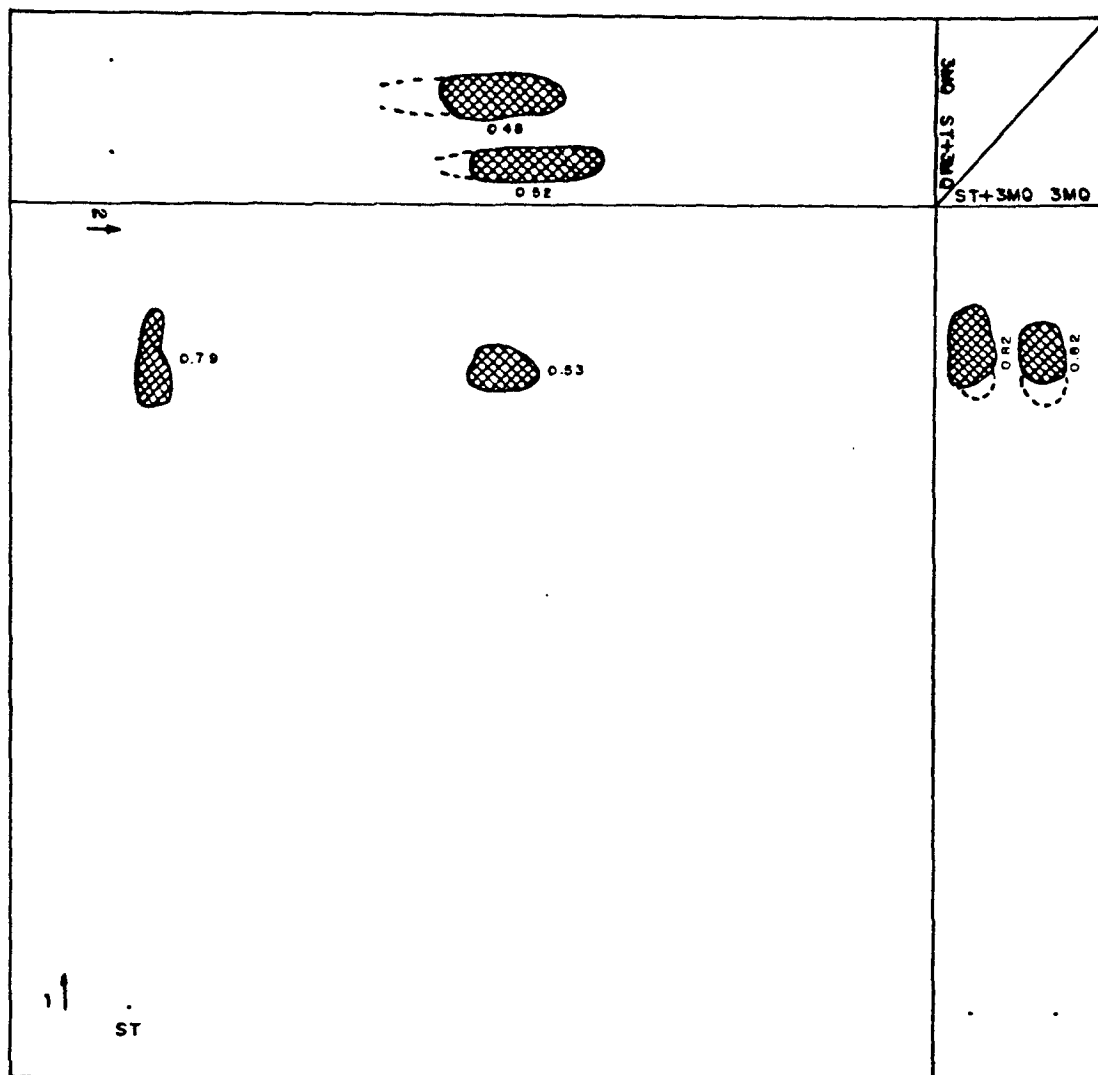


FIGURA 17 - Cromatografia bidimensional da substância T (ST), 3-O-metilquercetina (3MQ) e da mistura ST + 3MQ nos sistemas II-4-1 (sentido 1) e II-4-2 (sentido 2).

3.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

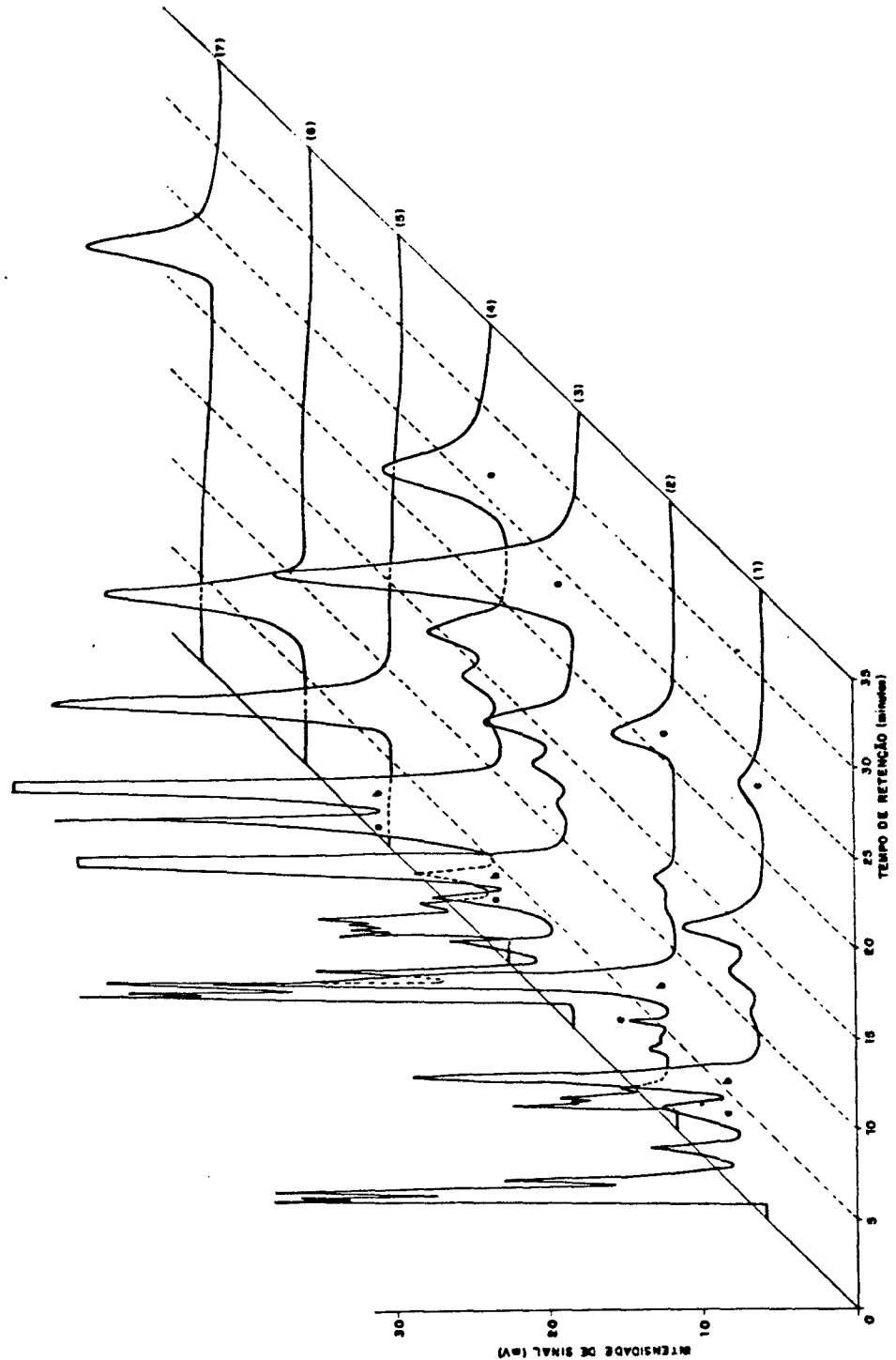


FIGURA 18 - Cromatogramas CLAE do macerado purificado (1), do macerado purificado adicionado de 3-0-metilquercetina (2), adicionado de 3-0-metilquercetina e eupatorina (3), adicionado de quercetina, 3-0-metilquercetina e eupatorina (4) e das substâncias referência quercetina (5), 3-0-metilquercetina (6) e eupatorina (7).

TABELA 16 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W), fator de resolução (Ri) e área dos picos (A) dos macerados purificados e das substâncias referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) em relação à quercetina (Q).

SUBSTÂNCIA/ PICO	TR (cm)	W (cm)	A (cm ²)	Ri
Q	3,2	1,12	5,15	-
3MQ	4,5	1,20	3,72	1,12
EUP	12,4	1,40	2,80	7,30
(1)a	3,1	0,82	1,63	-
(1)b	4,1	0,81	4,38	1,23
(1)c	12,0	2,00	0,73	6,31
(2)a	3,0	0,27	0,17	-
(2)b	3,7	0,79	5,45	1,32
(2)c	12,1	1,41	1,38	10,83
(3)a	3,4	0,80	1,60	-
(3)b	4,4	0,85	8,80	1,21
(3)c	12,3	2,00	9,30	6,35
(4)a	3,6	0,90	6,12	-
(4)b	4,7	0,92	8,37	1,21
(4)c	12,5	2,50	4,63	5,24

3.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

3.4.1 Estudo do Comportamento Espectroscópico no UV das Substâncias Referência 3-0-metilquercetina (3MQ) e Eupatorina (EUP)

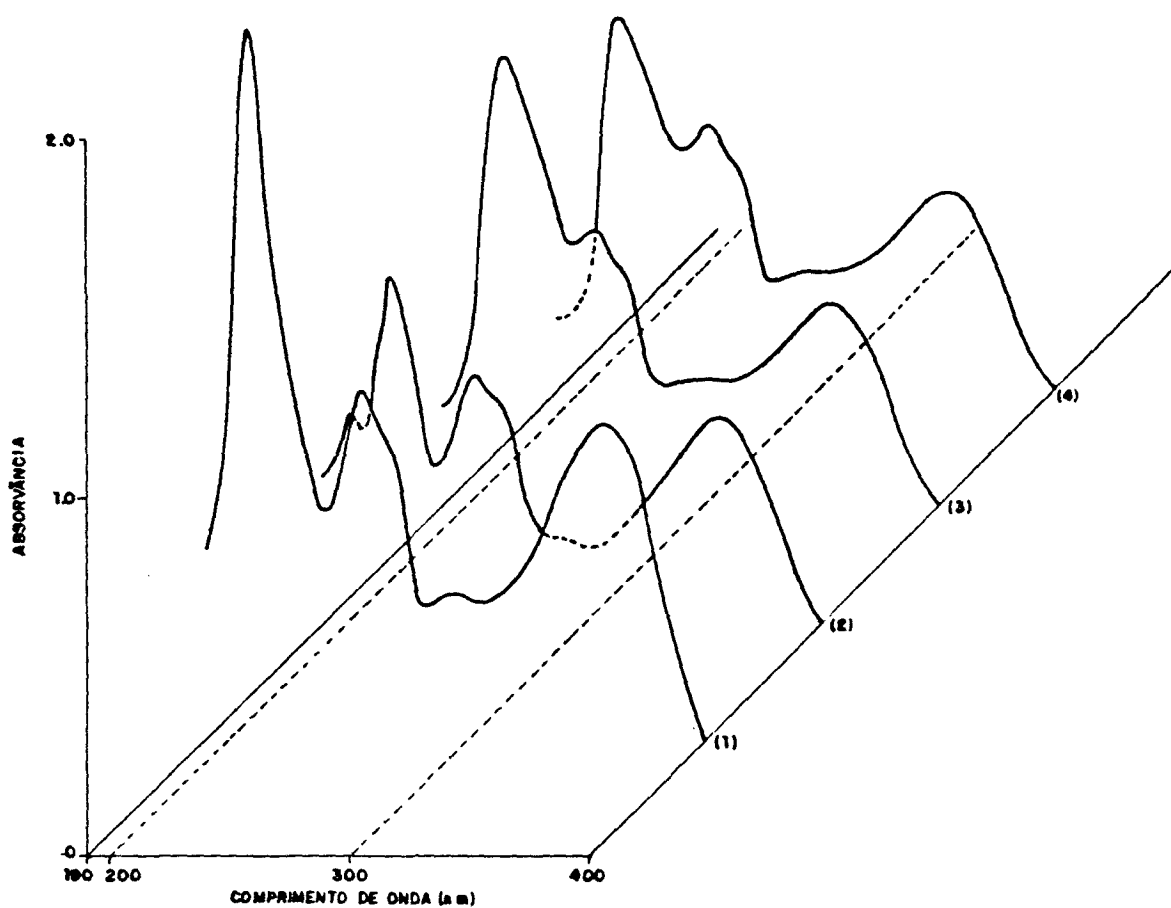


FIGURA 19 - Espectros UV das soluções metanólicas de 3-0-metilquercetina. 1 = padrão; 2 = padrão eluído do cromatograma; 3 = substância T eluída do cromatograma do extrato turbolizado e 4 = do extrato turbolizado purificado após cromatografia.

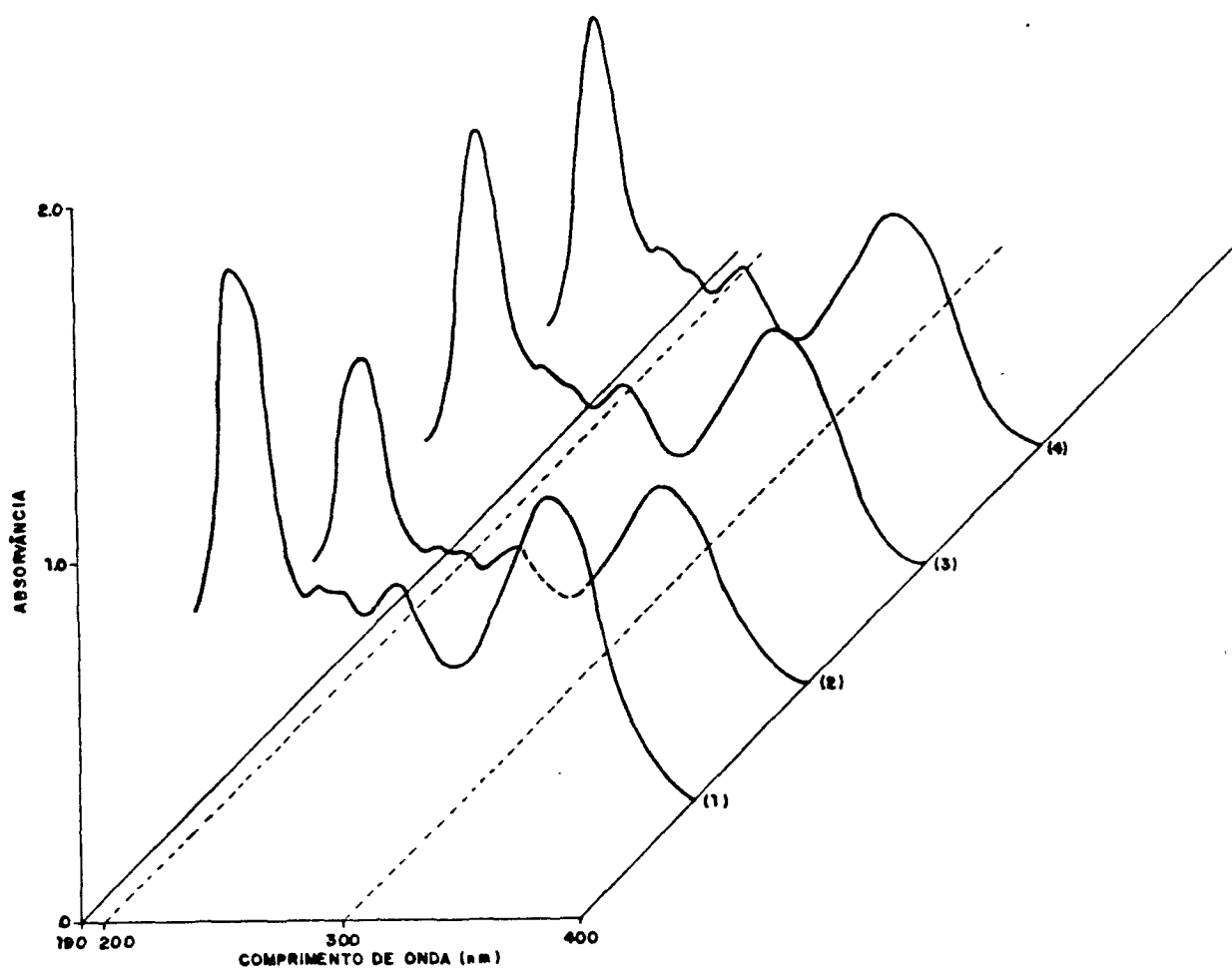


FIGURA 20 - Espectros UV das soluções metanólicas de eupatori-
na. 1 = padrão; 2 = padrão eluído do cromatogra-
ma; 3 = de eupatorina do extrato turbolizado e 4 =
do extrato turbolizado purificado após cromatogra-
fia.

3.4.2 Método CCD/UV

3.4.2.1 Para 3-0-metilquercetina (3MQ)

TABELA 17 - Valores de absorção da solução metanólica padrão de 3-0-metilquercetina (3MQ), determinados diretamente e após separação cromatográfica (CCD/UV), a 358nm.

CONCENTRAÇÃO DE 3MQ (mg/ml)	n	CCD/UV Abs. ± s (CV%)	UV DIRETO Abs. ± s (CV%)
0,005	3	0,123 ± 0,0045 (3,66)	0,232 ± 0,0017 (0,73)
0,010	3	0,256 ± 0,0087 (3,40)	0,462 ± 0,0060 (1,30)
0,015	3	0,419 ± 0,0211 (5,04)	0,693 ± 0,0032 (0,46)
0,020	3	0,500 ± 0,0090 (1,80)	0,923 ± 0,0046 (0,50)

3.4.2.2 Para eupatorina (EUP)

TABELA 18 - Valores de absorção da solução metanólica padrão de eupatorina (EUP), determinados diretamente e após separação cromatográfica (CCD/UV,, a 342nm.

CONCENTRAÇÃO DE EUP (mg/ml)	n	CCD/UV Abs. ± s (CV%)	UV DIRETO Abs. ± s (CV%)
0,004	3	0,090 ± 0,0042 (4,67)	0,186 ± 0,0025 (1,34)
0,008	3	0,182 ± 0,0080 (4,40)	0,359 ± 0,0066 (1,84)
0,012	3	0,266 ± 0,0040 (1,50)	0,540 ± 0,0056 (1,04)
0,016	3	0,362 ± 0,0055 (1,52)	0,715 ± 0,0054 (0,90)
0,020	3	0,449 ± 0,0065 (1,45)	0,880 ± 0,0055 (0,40)

TABELA 19 - Concentração de 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos extratos turbolizado (ET) e turbolizado purificado (ETP) pelo método CCD/UV segundo a equação (6) (2.2.17.2).

EXTRATO	VOLUME APLICADO (ml)	n	λ (nm)	3MQ Abs. \pm s (CV%)	EUP Abs. \pm s (CV%)	3MQ (%).10 ³	EUP (%).10 ³
ET	0,4	3	358	0,330 \pm 0,018 (5,45)		39,75	
ETP	0,4	3	358	0,272 \pm 0,005 (1,88)		32,74	
ET	0,4	3	342		0,171 \pm 0,006 (3,53)		23,76
ETP	0,4	3	342		0,135 \pm 0,001 (0,74)		18,74

3.4.3 Método CLAE

3.4.3.1 Para 3-0-metilquercetina (3MQ)

TABELA 20 - Área dos picos da substância referência 3-0-metilquercetina (3MQ) para a curva padrão por CLAE.

CONCENTRAÇÃO 3MQ (mg/ml)	n	ÁREA (μ V.s).10 ⁶ $\bar{x} \pm s$ (CV%)
0,05	3	0,375055 \pm 0,013 (3,47)
0,10	3	0,768454 \pm 0,008 (1,05)
0,20	3	1,796666 \pm 0,009 (0,05)
0,40	3	2,748268 \pm 0,008 (0,30)

3.4.3.2 Para eupatorina (EUP)

TABELA 21 - Área dos picos da substância referência eupatorina (EUP) obtida por CLAE.

CONCENTRAÇÃO EUP (mg/ml)	n	ÁREA ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$). 10^6 $\bar{x} \pm s$ (CV%)
0,0512	3	0,266596 \pm 0,0026 (0,98)
0,1280	3	0,767424 \pm 0,0016 (0,21)
0,3200	3	1,932926 \pm 0,0130 (0,67)
0,8000	3	4,790655 \pm 0,0024 (0,05)

TABELA 22 - Concentração de 3-0-metilquercetina padrão (3MQp), no extrato turbolizado purificado (3MQe), de eupatorina padrão (EUPp) e no extrato turbolizado purificado (EUPe) segundo a equação (7) (2.2.17.3).

SUBSTÂNCIA	n	CONCENTRAÇÃO (mg/ml)	ÁREA DO PICO (cm^2) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (%; m/V). 10^3
3MQp	3	0,2	4,45 \pm 0,099 (2,23)	
3MQe	3		4,22 \pm 0,044 (1,04)	94,83
EUPp	3	0,0512	0,96 \pm 0,044 (4,58)	
EUPe	3		1,08 \pm 0,074 (6,83)	28,80

3.5 ANÁLISE FATORIAL DOS MACERADOS (MC)

TABELA 23 - Valor do pH dos líquidos extratores e dos macerados (MC) à temperatura ambiente pela média de três determinações.

MC Nº	ÁGUA	ETANOL	ÁGUA:ETANOL	MC $\bar{x} \pm s$ (CV%)
1	5,50 \pm 0,070 (1,27)	6,84 \pm 0,006 (0,09)	4,80 ^a \pm 0,010 (0,21)	5,74 \pm 0,025 (0,44)
2	5,83 \pm 0,025 (0,43)	6,83 \pm 0,000	4,77 ^a \pm 0,000	5,76 \pm 0,028 (0,49)
3	5,59 \pm 0,000	6,80 \pm 0,000	5,50 ^b \pm 0,000	5,98 \pm 0,021 (0,35)
4	5,60 \pm 0,000	6,80 \pm 0,000	4,60 ^a \pm 0,000	5,77 \pm 0,015 (0,26)
5	5,43 \pm 0,029 (0,53)	6,63 \pm 0,029 (0,44)	5,61 ^b \pm 0,017 (0,30)	6,04 \pm 0,020 (0,33)
6	5,78 \pm 0,000	6,75 \pm 0,000	4,77 ^a \pm 0,000	5,74 \pm 0,046 (0,80)
7	5,50 \pm 0,006 (0,11)	6,83 \pm 0,006 (0,09)	5,50 ^b \pm 0,000	6,00 \pm 0,011 (0,18)
8	5,87 \pm 0,058 (0,99)	6,85 \pm 0,000	5,60 ^b \pm 0,000	6,00 \pm 0,022 (0,37)

Solução extrativa hidroalcoólica a = 50:50 e b = 70:30 (V/V)

TABELA 24 - Teor alcoólico dos macerados (MC) a 15°C e a 20°C determinado respectivamente, por areômetro (A) e por alcoômetro de Gay-Lussac (B) (n = 3).

MC Nº	(A) 15°C $\bar{x} \pm s$ (CV%) (%; V/V)	(B) 20°C $\bar{x} \pm s$ (CV%) (%; V/V)	(A)-(B)
1 ^a	47,67 ± 0,58 (1,22)	45,67 ± 0,58 (1,27)	2,00
2 ^a	45,33 ± 0,58 (1,28)	42,67 ± 0,58 (1,36)	2,66
3 ^b	69,67 ± 0,58 (0,83)	67,33 ± 1,15 (1,71)	2,34
4 ^a	48,33 ± 0,58 (1,20)	45,67 ± 0,29 (0,64)	2,66
5 ^b	68,67 ± 0,58 (0,85)	65,67 ± 0,58 (0,88)	3,00
6 ^a	45,67 ± 0,58 (1,27)	43,33 ± 0,58 (1,34)	2,34
7 ^b	69,00 ± 0,00	65,67 ± 0,58 (0,88)	3,33
8 ^b	68,00 ± 1,00 (1,47)	65,00 ± 1,00 (1,54)	3,00

TABELA 25 - Resíduo seco total (RST) para os macerados (MC) (n = 9).

MC Nº	PESO EXTRATO (g) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	RESÍDUO SECO (g) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	RST (%; m/m)
1	18,5797 ± 0,331 (1,78)	0,5171 ± 0,0134 (2,59)	4,18
2	18,8616 ± 0,029 (0,15)	0,5449 ± 0,0088 (1,62)	4,33
3	17,7401 ± 0,044 (0,25)	0,5484 ± 0,0041 (0,75)	4,64
4	18,6647 ± 0,023 (0,12)	0,5019 ± 0,0072 (1,44)	4,03
5	17,8493 ± 0,015 (0,08)	0,5495 ± 0,0067 (1,22)	4,62
6	18,8151 ± 0,024 (0,13)	0,4869 ± 0,0090 (1,85)	3,88
7	17,8010 ± 0,034 (0,19)	0,4902 ± 0,0072 (1,47)	4,13
8	17,9268 ± 0,040 (0,22)	0,4453 ± 0,0046 (1,03)	3,73

TABELA 26 - Resíduo seco purificado (RSP) para os macerados (MC) (n = 3).

MC Nº	RESÍDUO SECO TOTAL (g) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	RESÍDUO SECO PURIFICADO (g) $\bar{x} \pm s$ (CV%)	RSP (%; m/m)
1	0,5548 ± 0,003 (0,54)	0,0407 ± 0,002 (4,91)	0,33
2	0,5875 ± 0,008 (1,36)	0,3420 ± 0,011 (3,22)	2,72
3	0,5821 ± 0,007 (1,20)	0,1397 ± 0,011 (7,87)	1,18
4	0,5337 ± 0,005 (0,94)	0,0884 ± 0,007 (7,92)	0,71
5	0,5759 ± 0,003 (0,52)	0,1525 ± 0,008 (5,25)	1,28
6	0,5162 ± 0,014 (2,71)	0,0748 ± 0,002 (2,67)	0,60
7	0,5073 ± 0,006 (1,18)	0,0865 ± 0,008 (9,25)	0,73
8	0,5053 ± 0,014 (2,77)	0,1403 ± 0,012 (8,55)	1,17

TABELA 27 - Concentração de 3-O-metilquercetina (3MQ) para os macerados purificados (MCP) utilizando-se da equação (7) (2.2.17.3).

MCP Nº	n	ÁREA DO PICO (μ V.s) . 10 ⁶ $\bar{x} \pm s$ (CV%)	3MQ (%; m/V)
1	3	1,074047 ± 0,026 (2,42)	69,88
2	3	6,743045 ± 0,072 (1,07)	438,74
3	3	1,417015 ± 0,030 (2,12)	92,20
4	3	0,706766 ± 0,043 (6,08)	45,99
5	3	1,276932 ± 0,122 (9,55)	83,08
6	3	0,627309 ± 0,020 (3,19)	40,82
7	3	1,154231 ± 0,136 (11,78)	75,10
8	3	1,174158 ± 0,024 (2,04)	76,40

TABELA 28 - Concentração de eupatorina (EUP) para os macerados purificados (MCP) utilizando-se da equação (7) (2.2.17.3).

MCP Nº	n	ÁREA DO PICO ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$). 10^6 $\bar{x} \pm s$ (CV%)		EUP (%; m/V)
1	3	0,217977 \pm 0,017	(7,80)	20,93
2	3	0,435980 \pm 0,005	(1,15)	41,87
3	3	0,254598 \pm 0,021	(8,25)	24,45
4	3	0,126456 \pm 0,017	(13,44)	12,14
5	3	0,227720 \pm 0,020	(8,78)	21,87
6	3	0,106547 \pm 0,007	(6,57)	10,23
7	3	0,167405 \pm 0,016	(9,56)	16,08
8	3	0,272157 \pm 0,009	(3,31)	26,13

TABELA 29 - Efeitos e interações (E/I) calculados a partir da forma padrão sobre o pH, teor alcoólico (TA), resíduo seco total (RST), resíduo seco purificado (RSP) e concentração de 3-O-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) nos extratos macerados.

E/I	pH (.10 ³)	TA (.10 ²)	RST (.10 ³)	RSP (.10 ³)	3MQ	EUP
E _A	+ 12,50	-183,50	-7,75	+88,58	+88,97	+6,63
E _B	+252,50	+2183,50	-4,35	-6,73	-66,94	+0,84
E _C	-2,50	-25,00	-58,90	-71,23	-111,40	-11,14
I _{AB}	+8,75	+37,50	-7,08	-27,64	-46,44	-1,45
I _{AC}	-13,75	+8,25	-11,10	-34,24	-45,45	-1,28
I _{BC}	-3,75	-33,25	-11,15	+19,26	+49,75	+4,54
I _{ABC}	-1,25	+4,00	-0,40	+44,49	+48,06	+4,44

3.5.1 Cálculos para Análise da Variância

TABELA 30 - Áreas dos picos das substâncias 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) dos macerados purificados (MCP) por CLAE para análise da variância (AV).

MCP Nº		3MQ ($\mu\text{V.s}$). 10^6	EUP ($\mu\text{V.s}$). 10^6
1	a	1,098180	0,205195
1	b	1,046554	0,211112
1	c	1,077407	0,237625
2	a	6,729665	0,430937
2	b	6,820387	0,435670
2	c	6,679082	0,441333
3	a	1,383426	0,234977
3	b	1,440373	0,252791
3	c	1,427246	0,276025
4	a	0,665563	0,114650
4	b	0,752091	0,118718
4	c	0,702644	0,146001
5	a	1,142117	0,204303
5	b	1,309023	0,239084
5	c	1,379656	0,239774
6	a	0,650704	0,102090
6	b	0,612635	0,114930
6	c	0,618588	0,102621
7	a	1,072442	0,176631
7	b	1,078621	0,148736
7	c	1,311629	0,176848
8	a	1,195034	0,270848
8	b	1,179876	0,263570
8	c	1,147564	0,282052

3.5.1.1 Teste Fisher (Teste F)

3.5.1.1.1 Para 3-0-metilquercetina (3MQ)

Após a entrada dos dados, utilizando o programa STATITCF, obteve-se os seguintes dados.

TABELA 31 - Dados do teste F para 3-0-metilquercetina obtidos por CLAE dos macerados purificados.

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAU DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	TESTE F
A	11,22	1	11,22	2084,67
B	6,39	1	6,39	1187,99
C	17,59	1	17,59	3268,59
AB	12,23	1	12,23	2271,88
AC	11,71	1	11,71	2176,41
BC	14,03	1	14,03	2607,96
ABC	13,09	1	13,09	2432,81
RESÍDUO	0,09	16	0,01	
TOTAL	86,35	23	3,75	

$$F_{\text{tab } 0,05; 1,16} = 4,49$$

3.5.1.1.2 Para eupatorina (EUP)

TABELA 32 - Dados do teste F para eupatorina obtidos por CLAE dos macerados purificados.

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAU DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	TESTE F
A	0,03	1	0,03	123,37
B	0,00	1	0,00	1,98*
C	0,08	1	0,08	348,33
AB	0,01	1	0,01	23,41
AC	0,00	1	0,00	18,30
BC	0,05	1	0,05	231,70
ABC	0,05	1	0,05	221,22
RESÍDUO	0,00	16	0,00	
TOTAL	0,23	23	0,01	

$$F_{\text{tab } 0,05; 1,16} = 4,49$$

* Diferença não significativa

3.5.1.2 Método de Yates (GUPTA & MATHAI, 1980)

Utilizou-se para o método de YATES, além da somatória das áreas dos picos das substâncias 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP), a Tabela 4 e a equação (15), obtendo-se os valores estimados ($\hat{\Psi}$).

TABELA 33 - Valores estimados ($\hat{\Psi}$) para as áreas dos picos nos tratamentos das substâncias 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP).

TRATAMENTOS	$\hat{\Psi}$ ($\mu\text{V.s}$). 10^6 3MQ	$\hat{\Psi}$ ($\mu\text{V.s}$). 10^6 EUP
\hat{i}	3,543376	0,452210
\hat{a}	1,367346	0,068992
\hat{b}	-1,032208	0,008730
$\hat{a}\hat{b}$	-1,427424	-0,030055
\hat{c}	-1,712144	-0,115928
$\hat{a}\hat{c}$	-1,397111	-0,026571
$\hat{b}\hat{c}$	1,529365	0,094549
$\hat{a}\hat{b}\hat{c}$	1,477116	0,092385

3.5.1.3 Método de Tukey (método T) (GUPTA & MATHAI, 1980)

Com os valores estimados ($\hat{\Psi}$) (Tabela 33), aplicou-se a equação (16) para o método T obtendo-se os valores estimados dos picos da 3-0-metilquercetina (equação 17 e Tabela 34):

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot q_{2, 24-2; 0,05} \cdot \sqrt{5,3532864 \cdot 10^{-3}}$$

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm (0,57735026) \cdot (2,92) \cdot (0,073166156)$$

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm 0,123348 \tag{17}$$

e para os valores estimados de eupatorina (equação 18 e Tabela 35):

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot q_{2, 24-2; 0,05} \cdot \sqrt{0,000139}$$

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm (0,57735026) \cdot (2,92) \cdot (0,011790)$$

$$\Psi = \hat{\Psi}_n \pm 0,019876 \quad (18)$$

TABELA 34 - Valores de Ψ do método de TUKEY (método T) através da equação (17) para as áreas de 3-0-metilquercetina obtidas por CLAE.

Nº	IDENTIFICAÇÃO ($\hat{\Psi}_n$)	+0,123348	-0,123348
1	l - a	2,299378	2,052682
2	l - b	4,698932	4,452236
3	l - ab	5,094148	4,847452
4	l - c	5,378868	5,132172
5	l - ac	5,063835	4,817139
6	l - bc	2,137359	1,890663
7	l - abc	2,189608	1,942912
8	a - b	2,522902	2,276206
9	a - ab	2,918118	2,671422
10	a - c	3,202838	2,956142
11	a - ac	2,887805	2,641109
12	a - bc	-0,038671	-0,285367
13	a - abc	0,013578	-0,233118
14	b - ab	0,518564	0,271868
15	b - c	0,803284	0,556588
16	b - ac	0,488251	0,241555
17	b - bc	-2,438225	-2,684921
18	b - abc	-2,385976	-2,632672
19	ab - c	0,408068	0,161372
20	ab - ac	0,093035	-0,153661
21	ab - bc	-2,833441	-3,080137
22	ab - abc	-2,781192	-3,027088
23	c - ac	-0,191685	-0,438381
24	c - bc	-3,118161	-3,364857
25	c - abc	-3,065912	-3,312608
26	ac - bc	-2,803128	-3,049824
27	ac - abc	-2,750879	-2,997575
28	bc - abc	0,175597	-0,071099

TABELA 35 - Valores de ψ do método de TUKEY (método T) através da equação (18) para as áreas de eupatorina obtidas por CLAE.

Nº	IDENTIFICAÇÃO ($\hat{\psi}_n$)	+0,019876	-0,019876
1	$\hat{l} - \hat{a}$	0,403094	0,363342
2	$\hat{l} - \hat{b}$	0,463356	0,423604
3	$\hat{l} - \hat{ab}$	0,502141	0,462389
4	$\hat{l} - \hat{c}$	0,588014	0,548262
5	$\hat{l} - \hat{ac}$	0,498657	0,458905
6	$\hat{l} - \hat{bc}$	0,377537	0,337785
7	$\hat{l} - \hat{abc}$	0,379701	0,339949
8	$\hat{a} - \hat{b}$	0,080138	0,040386
9	$\hat{a} - \hat{ab}$	0,118923	0,079171
10	$\hat{a} - \hat{c}$	0,204796	0,165044
11	$\hat{a} - \hat{ac}$	0,115439	0,075687
12	$\hat{a} - \hat{bc}$	-0,005681	-0,045433
13	$\hat{a} - \hat{abc}$	-0,003517	-0,043269
14	$\hat{b} - \hat{ab}$	0,058661	0,018909
15	$\hat{b} - \hat{c}$	0,144534	0,104782
16	$\hat{b} - \hat{ac}$	0,055177	0,015425
17	$\hat{b} - \hat{bc}$	-0,065943	-0,105695
18	$\hat{b} - \hat{abc}$	-0,063779	-0,103531
19	$\hat{ab} - \hat{c}$	0,105749	0,065997
20	$\hat{ab} - \hat{ac}$	0,016392	-0,023360
21	$\hat{ab} - \hat{bc}$	-0,104728	-0,144480
22	$\hat{ab} - \hat{abc}$	-0,102564	-0,142316
23	$\hat{c} - \hat{ac}$	-0,069481	-0,109233
24	$\hat{c} - \hat{bc}$	-0,190601	-0,230353
25	$\hat{c} - \hat{abc}$	-0,188437	-0,228189
26	$\hat{ac} - \hat{bc}$	-0,101244	-0,140996
27	$\hat{ac} - \hat{abc}$	-0,099080	-0,138832
28	$\hat{bc} - \hat{abc}$	0,022040	-0,017712

4. DISCUSSÃO

Face aos diversos fatores que influenciam a qualidade final de um medicamento, somente o planejamento adequado de todas as fases de produção, iniciando com a avaliação benefício/risco do produto e seguindo com os demais passos de produção, garantirá o alcance e a manutenção da qualidade pretendida.

Dentro do ciclo de processamento, a qualidade é determinada pelas características da matéria-prima e, no caso de fitoterápicos, pela correta qualificação da droga vegetal.

Ponto de partida para alcançar estes objetivos é a correta classificação botânica, para em seguida determinar outros parâmetros como as características físico-químicas, químicas e tecnológicas.

A monografia existente na PHARMACOPÉIA (1929), enfocando as características morfológicas, é suficiente para identificação segura das partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC., permitindo diferenciá-la de outras espécies do mesmo gênero, como *Baccharis microcephala* (Less.) DC., por apresentar alas mais estreitas com pontuações glandulares e flores aglomeradas nas terminações dos ramos, *Baccharis crispa* Sprengel que se caracteriza pela presença de alas ondulares e ramos de segundo grau e com *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. e *Baccharis myriocephala* DC. pela distinta disposição dos capítulos nos ramos (CABRERA, 1974; BARROSO, 1976). Nota-se que é importante que esta avaliação seja

feita com exemplares floridos.

Convém lembrar que a denominação *Baccharis genistelloides* Persoon var. *trímera* Backer que consta da monografia farmacopéica não é mais atual, tendo sido sinonimizada para *Baccharis trímera* (Less.) DC. (BARROSO, 1976).

A avaliação botânica não assegura per si a constância do efeito terapêutico (ligada à composição química do vegetal). As plantas sofrem influências do meio e estas podem traduzir-se em alteração quali- e quantitativa dos seus constituintes, sendo portanto, imprescindível considerar fatores de clima, solo e estágio vegetativo, quando do controle de qualidade de uma matéria-prima vegetal isto, no entanto, foge ao escopo deste trabalho (MENßEN, 1979; FEHR, 1984).

Não foram diferenciados os exemplares masculinos e femininos do vegetal, conforme prática corrente na indústria farmacêutica.

Entre os diversos métodos aplicáveis a avaliação química de matérias-primas vegetais, a análise cromatográfica é indispensável.

O estabelecimento de um perfil cromatográfico em cromatografia em papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizado, como meio de caracterização para as partes aéreas de *Baccharis trímera* (Less.) DC..

O perfil cromatográfico, entendido como o comportamento dos valores de Rf de manchas selecionadas em diversos sistemas cromatográficos, permite, além da montagem de uma "impressão digital" para a droga, a possibilidade de emprego da computação, como método auxiliar na identificação rápida da mesma.

A cromatografia em papel (Figura 8), mostra claramente as dificuldades que se tem na separação do extrato turbolizado (ET), onde este apresenta a formação de uma cauda desde o ponto de aplicação até próximo ao fronte da fase móvel, sem zonas delimitadas, não permitindo sua utilização como método de caracterização. Embora a CP tenha sido utilizada na avaliação de matérias-primas com sucesso (SONAGLIO, 1987), neste caso não foi viável.

As cromatografias em camada delgada, nos sistemas I-1, I-2, I-3 e I-4 com reveladores R1 e R2, foram mais promissoras (Figura 9) demonstrando para o ET manchas com valores de Rf superiores a 0,68, que pelo comportamento frente aos reveladores, assemelham-se as dos componentes do óleo essencial extraído da matéria-prima vegetal. O sistema I-5 (Figura 9) apresentou nítida separação das manchas, caracterizando-o como o melhor sistema para o óleo essencial. O sistema I-6 (Figura 9) mostrou-se viável na separação das manchas, mas apresentou problemas na reprodutibilidade dos valores de Rf. O uso da celulose microcristalina (sistemas II-1 e II-2) não reproduziu a mesma situação de concordância entre mancha do ET com o padrão 3-O-metilquercetina, observada quando da CCD sobre sílicagel, descartando a possibilidade de seu emprego na caracterização do extrato.

Utilizando-se os sistemas I-7, I-8, I-9 e I-10 (Figuras 9 e 10) e considerando-se a zona vermelha, inferior a zona amarelo-clara à luz visível, escura sob luz UV366nm que passa a amarela brilhante após exposição a vapores de amônia sob luz UV366nm e a mancha superior amarelo-clara, é possível traçar um perfil cromatográfico para o extrato turbolizado (ET) (Figura 21).

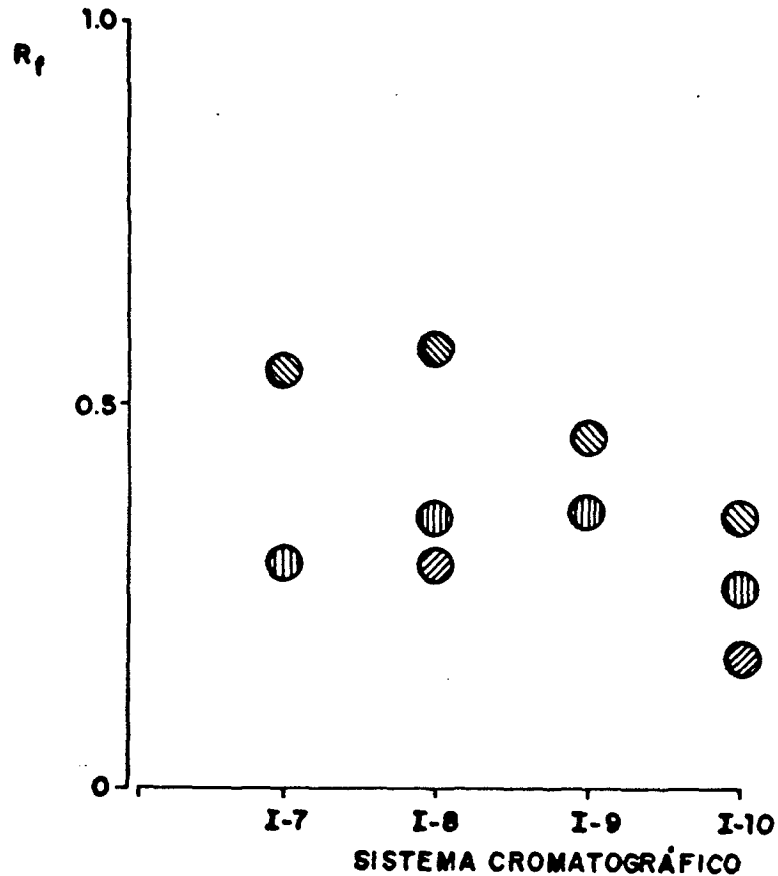


FIGURA 21 - Perfil cromatográfico para o extrato turbolizado por CCD. ⊘ = mancha vermelha; ⊙ = mancha amarela 3-O-metilquercetina (3MQ); ⊚ = eupatorina.

A presença de saponinas na carqueja (PAVAN, 1952) levou a realização do teste de espuma para sua confirmação e da determinação do índice de espuma que podem servir como método auxiliar de identificação da matéria-prima.

Convém lembrar porém que a presença de substâncias como proteínas, pode provocar aumento da tensão superficial levando a formação de espuma (SHAW, 1975).

A diferença observada do extrato turbolizado (ET), onde obteve-se índice de espuma menor que 100, em relação ao extrato aquoso, leva a crer que isto seja causado pela presença

de etanol, cuja atividade antiespumante é conhecida (SHAW, 1975a).

A determinação de extrativos é uma técnica auxiliar no controle de matéria-prima, tendo grande importância quando não existem métodos químicos ou biológicos para avaliar os constituintes ativos. A validade desta determinação se prende ao fato de se manter as mesmas condições do ensaio, já que fatores como granulometria da droga, temperatura de aquecimento e, especialmente, a escolha do líquido extrator podem levar a resultados diferentes (ZHI - CEN, 1980).

A carqueja pode ser incluída entre as drogas denominadas amargas. A diversidade estrutural das substâncias que produzem este sabor faz necessária a utilização de um teste geral, com características semi-quantitativas.

ARAÚJO (1957) em seu trabalho com a *Baccharis riograndensis* Teodoro & Vidal, pressupõe ser a absintina (muito solúvel no álcool) a substância amarga, afirmando ser este o princípio amargo estimulante do apetite.

Por se tratar de uma planta com características amargas, PAVAN (1952) empregou o índice de amargor, concluindo que a *Baccharis trimera* (Less.) DC. possui este índice bastante elevado, se comparado com o de outras plantas usadas com o mesmo fim.

O valor do índice de amargor encontrado para o decocto foi muito inferior ao apresentado por PAVAN (1952). No entanto, o coeficiente de variação de 183% (Tabela 9) impede que este ensaio tenha validade para o ET. A diferença observada entre o DE e ET parece ter como responsável o álcool, por este lesar as células precipitando e desidratando o proto-

plasma, além de ser irritante às mucosas e sensibilizar as papilas linguais (fungiformes e valadas), tornando-as mais sensíveis ao amargor, se comparado com a água utilizada na preparação do DE (GUYTON, 1977; RITCHIE, 1985).

A distribuição granulométrica influi na reprodutibilidade da extração, já que este fenômeno está relacionado com a superfície (fase de lixiviação) e espessura (fase de difusão) das partículas em contato com o líquido extrator.

A Figura 22 representa as curvas características de retenção e passagem da droga rasurada através da análise granulométrica por tamisação, empregando-se os dados fornecidos pela Tabela 8 (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982). O diâmetro médio, calculado graficamente a partir do ponto de intersecção das retas, foi de 0,640mm. Outro parâmetro para caracterização de materiais particulados calculado a partir destas retas é o do ângulo de inclinação, que neste caso foi de aproximadamente $36^{\circ}52'$.

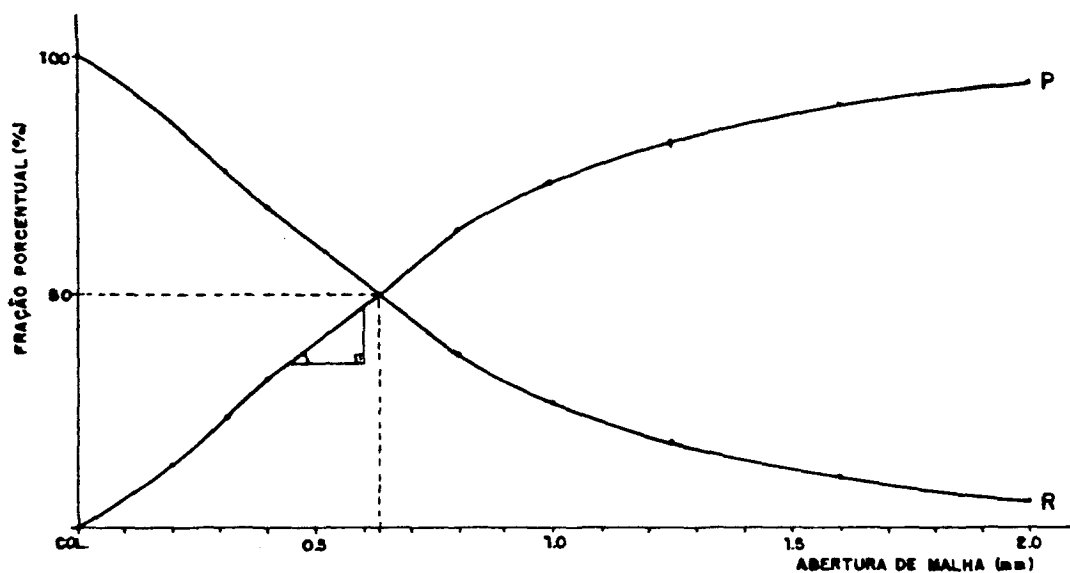


FIGURA 22 - Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal.

Dentre as condições que influenciam a qualidade da matéria-prima vegetal deve-se analisar sua estabilidade frente ao tempo de armazenamento.

Considerando-se a quantidade de óleo essencial na planta durante um período de armazenamento de 20 meses após a secagem, pode-se observar na Figura 23 que a quantidade de óleos essenciais sofre um decréscimo acentuado nos primeiros cinco meses de armazenamento, mostrando até o vigésimo mês uma tendência de redução mais lenta. No período observado a diminuição do volume de óleos essenciais chegou a 74,36%.

Já a perda por dessecação que considera a retirada de substâncias voláteis pelo calor, tem um comportamento semelhante (Figura 23) acompanhando quase que paralelamente o teor de óleo essencial. No tempo de estudos a perda total por dessecação foi de 68,58%, o que sugere uma estabilização no período após o nono mês, em virtude do armazenamento.

No período que vai da coleta até o nono dia de secagem em estufa de ar circulante, quando o material vegetal encontra-se totalmente quebradiço, a relação entre o vegetal fresco e vegetal seco é de aproximadamente 28%. Para se conseguir o mesmo volume de óleo essencial é necessário cerca de 3,55 vezes, teoricamente, mais matéria-prima fresca.

O valor do pH das soluções extrativas pode servir também como critério de qualidade.

Além do tipo do solvente, as condições de sua obtenção podem influir no pH final, como observa-se nas Tabelas 11 e 23 para a água obtida de dois destiladores diferentes.

PAL & NANDY (1983) observando o efeito do álcool diluído, duração da maceração e sólidos totais em tintura de *Eugenia*

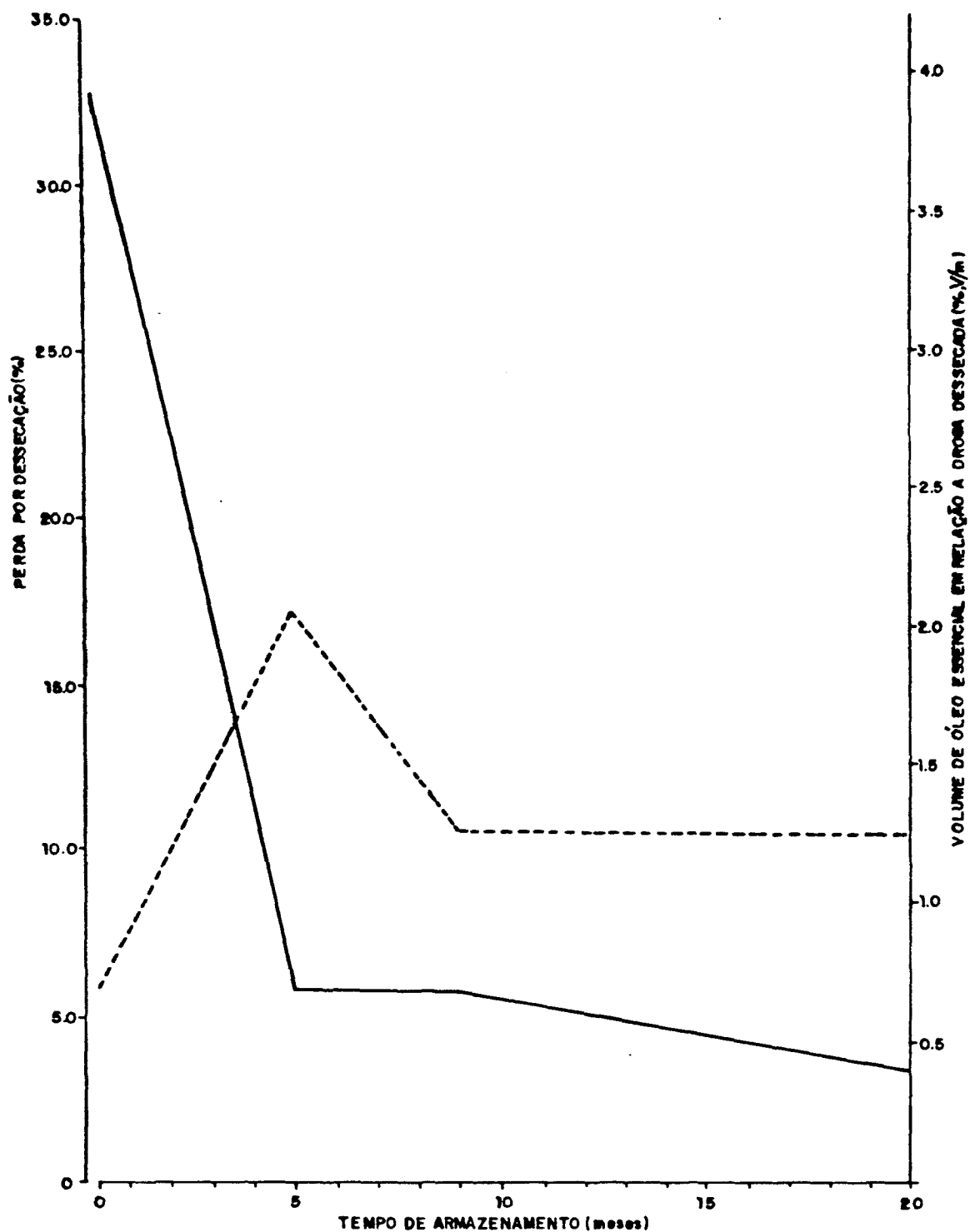


FIGURA 23 - Volume de óleo essencial (-) e perda por dessecação (---) em função do tempo de armazenamento da matéria-prima vegetal.

jambolana Lam. sobre o pH dos extratos verificaram que o mesmo poderia sofrer alterações devidas ao contato prolongado com vidro ou também à concentração das substâncias extraídas.

Tanto para o decocto como para o extrato turbolizado a determinação do pH ocorreu, por conseguinte, logo após a sua preparação (Tabela 11).

A diferença de pH entre os dois extratos (15%) não pode ser explicada pela variação do valor da concentração hidrogeniônica da água ou através da influência do etanol, levando a crer que esta seja devido a concentração e/ou ao tipo de substâncias extraídas.

Para os macerados (Tabela 23), as misturas hidroalcoólicas mostraram-se com valores de pH mais ácido que os extratos. Considerando-se as duas concentrações etanólicas usadas, nota-se que não houve correlação estatisticamente significativa entre o incremento do teor alcoólico e o pH dos extratos referentes, sugerindo assim que a variação destes valores seja devido a natureza dos extrativos contidos nos extratos.

Através dos valores apresentados na Tabela 24 pode-se constatar que não houve diferença significativa quando do emprego do areômetro ou do alcoômetro de Gay-Lussac. O teor etanólico dos extratos no entanto diferencia-se dos valores obtidos para as misturas hidroalcoólicas I e II. Este fato é possível de se explicar pela unidade residual existente na droga após secagem (Tabela 5).

A maior diferença numérica dos teores alcoólicos entre os pares extrato/mistura etanólica II e o extrato/mistura etanólica I não subsiste a uma análise estatística ($t_c = 2,776I/$
 $t_c = 4,8135II$).

O resíduo seco como medida do poder extrativo do solvente e da metodologia de extração, mostra, na comparação entre o ET e o DE, que a turbolização em meio hidroalcoólico foi praticamente duas vezes mais eficiente do que a decocção.

Este resultado, embora esperado, demonstra que a contínua agitação do meio assim como a constante redução das partículas da droga entre os rotores, aumentando as superfícies de contato sólido/líquido, elevam drasticamente o rendimento. Deve ser considerada ainda que a turbolização é uma operação de extração menos drástica aos constituintes do vegetal do que a exposição ao calor quando da decocção.

A desvantagem da turboextração consiste no entanto na produção de partículas finíssimas, que podem passar através do filtro, falseando deste modo o valor do rendimento.

Para a avaliação quantitativa de misturas complexas tem-se como alternativa mais viável aqueles métodos que permitam concomitantemente a separação e o doseamento dos diversos componentes. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além de cumprir este requisito alia uma grande exatidão e elevada reprodutibilidade.

Os cromatogramas obtidos por CLAE na análise dos extratos purificados do DE e ET apresentam uma diferença significativa entre os picos correspondentes a 3-O-metilquercetina na ordem de 19,0 vezes (Figuras 6 e 11). Demonstra-se certa correlação entre os valores dos resíduos secos dos extratos (cerca de 52%), como já foi discutido acima, reforçando a vantagem do emprego da turbolização em meio hidroalcoólico, com relação a decocção em água.

Os altos custos de aquisição e de manutenção de um cromatógrafo líquido de alta eficiência devem ser considerados quando da realização de uma rotina de qualificação e doseamento. Alternativamente a cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada acopladas a um método de quantificação podem ser empregadas. Convém lembrar que na caracterização através destes dois métodos cromatográficos não é recomendável comparar os valores de Rf obtidos experimentalmente com os citados na literatura sem considerar o desenvolvimento concomitante de substâncias de referência. Devido a influência de fatores tais como reprodutibilidade da camada da fase estacionária, temperatura ambiente, grau de saturação da câmara por exemplo, podem afetar a reprodutibilidade do valor do Rf (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

No decorrer da otimização cromatográfica em camada delgada (Figura 9), o sistema I-7 demonstrou nítida separação das zonas cromatográficas. A diferença na fase móvel entre os sistemas I-7 e I-8, substituindo o benzeno pelo tolueno, não prejudicou a resolução do cromatograma, tendo a vantagem da utilização do tolueno por ser menos tóxico que o benzeno (LARINI, 1987).

O aumento da polaridade entre os sistemas I-10 e I-12 provocou perda de resolução. Enquanto que o sistema menos polar I-10, apresentou boa resolução entre as manchas, o sistema I-12 produziu uma única mancha do ponto de aplicação ao meio da placa, não sendo possível verificar a presença das substâncias referência (Figura 9). Decidiu-se nas análises de caracterização, seja para ET, DE ou MC, ou mesmo de quantificação empregar o sistema cromatográfico I-8 (sílicagel 60 GF₂₅₄; tolueno: acetato de etila: metanol (75: 25: 5; V/V/V)).

Outro método cromatográfico utilizado, qualitativamente, foi a cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Esta metodologia apresentou boa capacidade de separação para eupatorina e 3-0-metilquercetina (Figura 10), aliada às vantagens de utilização do extrato bruto sem prévia purificação, baixo custo do equipamento, uso de quantidades reduzidas de fase fixa e solvente e da rapidez na obtenção de resultados. Como não existe nenhuma referência na literatura é possível sugerir a sua utilização na separação de misturas de compostos flavonoídicos e também como método auxiliar ou de escolha no controle de extrativos vegetais. A possibilidade de uma avaliação quantitativa parece ser viável.

Buscando-se um método para validar o processo de caracterização e até quantificação, por CCD, optou-se pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A prévia purificação do ET para uso na CLAE, é necessária para assegurar uma eficiente separação das substâncias e evitar por conseguinte que a coluna sofra saturação e possa vir a prejudicar a eficiência e a resolução dos cromatogramas.

No desenvolvimento das condições de separação para CLAE, do ETP, utilizou-se o sistema eluente metanol: ácido fórfico a 1% (V/V) em diversas proporções de volume e variando a velocidade de fluxo, obtendo-se uma boa resolução (Tabela 14), para as substâncias flavonoídicas, com metanol: ácido fórfico a 1% (V/V) na proporção de 40: 60 (V/V) e velocidade de fluxo de 2,0ml/minuto (Figura 11).

Comparando-se os cromatogramas representados na Figura 11 e os dados calculados para o fator de resolução (R_i) de 3-0-metilquercetina e eupatorina com relação a quercetina

(Tabela 14), observa-se a coincidência dos tempos de retenção e o aspecto dos picos das substâncias referência com picos do extrato turbolizado purificado. Os valores de R_i superiores a 1,00 (Tabela 14) demonstram haver uma separação nítida entre os picos, com sobreposição inferior a 2%, permitindo assim sua quantificação (HAMILTON & SEWELL, 1977a; MEYER, 1979a; SRIVASTAVA & KISHORE, 1985a).

Com a finalidade de se determinar quais os picos do extrato corresponderiam às substâncias flavonoídicas referência, foi realizada CLAE do extrato e do extrato adicionado destas substâncias (Figura 18 e Tabela 16).

A adição das mesmas não levou ao surgimento de novos picos, nem a alterações da aparência dos já existentes, aumentando especificamente a intensidade daqueles com TR semelhante ao da substância referência correspondente. Através desta análise cocromatográfica pode-se certificar a identidade dos picos do extrato como sendo as mesmas substâncias cocromatografadas.

Através do comportamento espectroscópico no UV e cromatográfico (CP, CCD, CLV e CLAE) procurou-se identificar a substância T (ST).

A espectroscopia no UV é uma prática comum na identificação de flavonóides. O espectro apresenta dois máximos de absorção, um na região de 300-400nm (denominado de banda I) e outro na região de 240-285nm (denominado de banda II). Aliado a este fator considera-se como outras vantagens deste método o emprego de pequena quantidade de substância referida e o volume de informações obtidos também pela adição de reagentes específicos de ionização e/ou quelação (MARKHAM &

MABRY, 1975a).

O comportamento espectroscópico no UV, tanto da 3-0-metilquercetina como da substância T, apresentado pela Tabela 15, foi obtido experimentalmente, em solução metanólica, e a esta adicionaram-se, separadamente, os reagentes específicos, tirando-se a cada adição o espectro da solução. Conseguiu-se desta maneira um perfil espectroscópico no UV, ocasionado pelos deslocamentos estruturais significativos, mostrado na Figura 12.

O espectro da ST (Figura 12) apresentou dois máximos (257 e 357nm) sugerindo a presença de um flavonol com grupo metoxila em C-3 e anel B dihidroxilado em posição "orto" (C-3' e C-4'). Da adição separadamente dos reagentes específicos foram calculados os desvios produzidos (Tabela 15 e Figura 12). O desvio batocrômico de 47nm da banda I sugere hidroxila livre em C-4' para a solução metanólica acrescida de metóxido de sódio. O desvio batocrômico de 35nm na banda Ia ocorrido entre a solução metanólica acrescida de cloreto de alumínio e ácido clorídrico em relação a esta solução sem o ácido clorídrico pressupõe dihidroxilação no anel B. Um desvio batocrômico de 46nm da banda I da solução metanólica em relação a banda Ia na mesma solução anterior permite supor a presença de hidroxila em C-5 e substituição em C-3. A solução metanólica acrescida de acetato de sódio com desvio batocrômico de 17nm na banda II sugere hidroxila em C-7 e nesta solução acrescida de ácido bórico com desvio batocrômico de 20 nm na banda I indica substituição "orto" no anel B, em relação à solução metanólica.

A coespectroscopia no UV das substâncias T e 3-0-metilquercetina resultou num espectro idêntico ao das substâncias isoladas (Figura 13). Não existe a possibilidade de mascaramento do padrão de 3MQ pela ST ou vice-versa, em virtude da

concentração da solução destas substâncias estarem muito próximas.

A utilização da CP na busca da caracterização da ST, demonstrado na Figura 14 nos diversos sistemas eluentes, sempre cocromatografados, forneceu dados que somados à CCD utilizando-se como adsorventes sílicagel 60GF₂₅₄ e celulose microcristalina (Figura 15) foram de extrema valia, obtendo-se assim um perfil cromatográfico da ST e 3MQ que permite sua identifi-

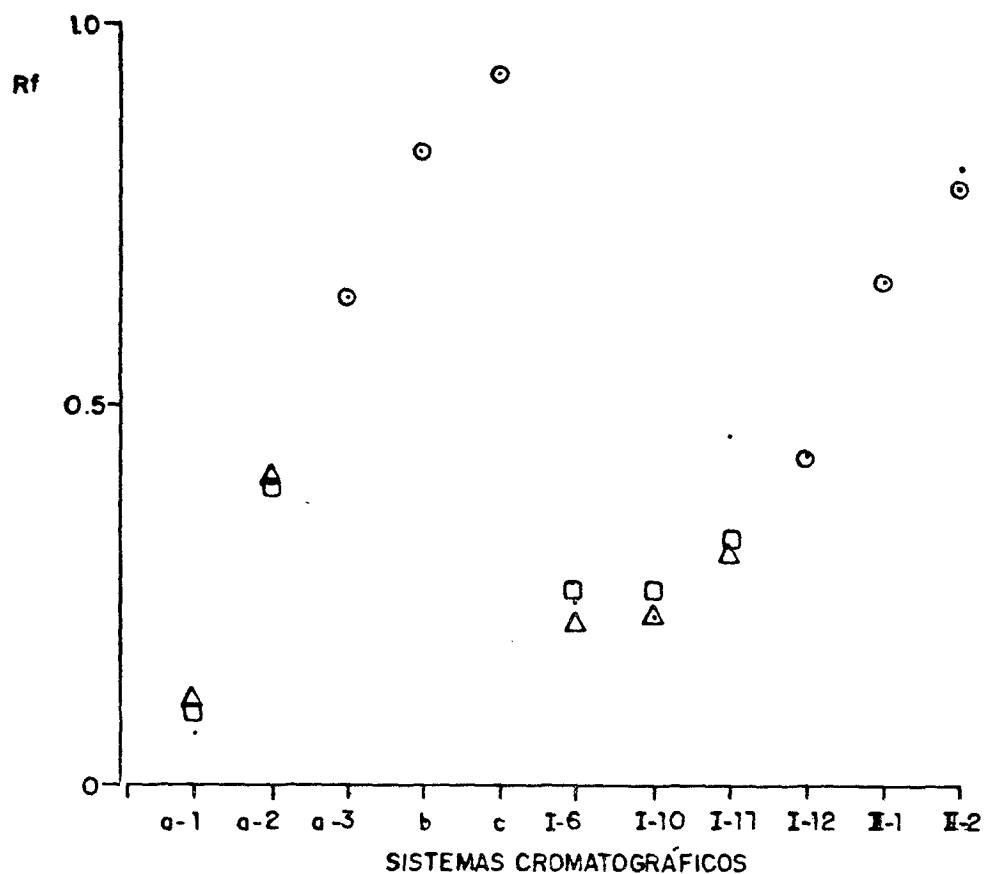


FIGURA 24 - Perfil cromatográfico da substância T (.), do flavonol 3-O-metilquercetina (Δ) e da sua mistura (□).

cação (Figura 24).

Os 11 sistemas apresentaram coincidência nos valores dos Rf.

Os sistemas cromatográficos II-3 e II-4 (2.2.13.2) utilizados por SIMÕES (1984) na caracterização e identificação de 3-0-metilquercetina foram processados, em CCD com celulose microcristalina, pela técnica bidimensional contra padrão de 3MQ e com cocromatografia (Figuras 16 e 17), apresentando coincidência de comportamento entre as substâncias.

A cromatografia líquida a vácuo complementou a avaliação cromatográfica na determinação da substância T. Após fracionamento com acompanhamento por CCD, demonstrou-se sua presença nas frações 22 e 23, do extrato turbolizado (Figura 10).

A substância T, eluída com metanol do sistema cromatográfico III-1, apresentou somente uma mancha quando recromatografada no sistema I-6 (Figura 15).

A CLAE foi também empregada como método auxiliar na confirmação da estrutura da substância T. A aplicação desta técnica cromatográfica permite relacionar o tempo de retenção com o padrão e tipo de substituição (VILLAR et alii, 1985; SONAGLIO, 1987; SIMÕES et alii, 1988).

Como a permanência sobre o suporte cromatográfico, neste caso octadecilsilano, é função da interação dos grupos funcionais da substância com a molécula hidrofóbica da fase estacionária e cresce com o número e existência de radicais hidrofóbicos, é de se esperar que a substância relativa ao primeiro pico majoritário, com um tempo de retenção de 1,3 minutos, seja algo mais polar do que o pico b, correspondente a

ST e bem mais polar que a substância com o maior tempo de retenção (Figuras 11 e 18). Como em flavonóides um aumento da hidrofobicidade pode estar relacionada com a substituição do hidrogênio hidroxílico por um grupo metila, tal resultado sugere a existência de padrões de metoxilação mais elevados nas substâncias com maior tempo de retenção.

A comparação entre os cromatogramas antes e após a adição das substâncias referência, quercetina, 3-0-metilquercetina e eupatorina, ao extrato, citada anteriormente, vem reforçar a correlação de que os picos modificados correspondem às substâncias referência.

Deste modo aliando o aspecto da influência da estrutura sobre o tempo de retenção e os dados da cocromatografia com substâncias referência, evidencia-se que a substância T seja idêntica a 3-0-metilquercetina. Explica-se com isto o tempo de retenção algo maior do que para a quercetina já que a diferença entre as duas situa-se no substituinte da posição 3, para a quercetina o grupo presente é a hidroxila e para a 3-0-metilquercetina, o grupo mais hidrofóbico, metoxila. A substância responsável no extrato pelo pico de maior tempo de retenção coincide com a eupatorina, trimetoxilada nas posições 6, 7, e 4', logo muito mais hidrofóbica que as anteriores.

Com a utilização da espectroscopia no UV e dos diferentes métodos cromatográficos (CP, CCD, CLV e CLAE) e verificando-se os dados de literatura (LEBRETON et alii, 1967; MARKHAM et alii, 1969; MABRY et alii, 1970a; SWAIN, 1976; SIMÕES, 1984; SONAGLIO, 1987), ficou evidenciada a coincidência estrutural entre a substância T e 3-0-metilquercetina. Vale ressaltar que até o presente momento não foi relatada a presença do flavonol 3-0-metilquercetina para o gênero *Baccharis*.

Procurando metodologia adequada que pudesse ser utilizada na padronização dos extratos das partes aéreas da carqueza, utilizaram-se dois métodos de quantificação, sendo um deles indireto (CCD/UV) e o outro a CLAE, pela injeção direta dos extrativos.

A presença de flavonóides no vegetal tais como eupatorina, quercetina, luteolina, nepetina ou eupafolina, apigenina e hispidulina (VICHNEWSKI et alii, 1976; HERZ et alii, 1977; SANTOS FILHO, 1979; SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987) e de 3-O-metilquercetina, como demonstrado acima, pode servir como argumento para classificar o vegetal em estudo entre as drogas flavonoídicas.

Seguindo monografias para esta classe de compostos, foi determinado o teor de flavonóides totais calculados como quercetina. Face as limitações deste método, o resultado não expressa as diferentes concentrações das substâncias isoladamente considerando sim a concentração global, servindo assim como parâmetro de avaliação da qualidade. Entretanto a determinação quantitativa de uma classe de compostos de interesse farmacológico é prática comum nos meios oficiais.

Em virtude disto utilizaram-se os flavonóides 3-O-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP), como substâncias referência, por terem apresentado boa resolução na CCD e CLAE (Figuras 9 e 11).

Para a otimização da técnica de doseamento CCD/UV para o extrato turbolizado (ET), o extrato turbolizado purificado (ETP) e para os padrões de 3MQ e EUP em solução metanólica, procedeu-se uma análise preliminar do comportamento no UV das manchas correspondentes aos padrões (Figuras 19 e 20). Tanto os padrões como as substâncias eluídas das manchas cromatográficas correspondentes dos extratos não sofreram qualquer tipo

de alteração nos máximos de absorção. Além disto observou-se uma manutenção das intensidades relativas das bandas de absorção para eupatorina entre a EUP-padrão e EUP-CCD e entre a EUP-ET e EUP-ETP (Tabela 36). As intensidades relativas semelhantes para a 3-0-metilquercetina ocorrem entre o padrão eluído do cromatograma (3MQ-CCD) com a substância eluída do extrato turbolizado purificado (3MQ-ETP) e com menor aproximação entre a 3MQ-padrão com a substância extraída do extrato turbolizado (3MQ-ET) (Tabela 37). Isto demonstra a inexistência de interação entre as substâncias e a fase estacionária ou uma possível instabilidade causada pela metodologia.

TABELA 36 - Intensidade relativa percentual de eupatorina (EUP) no UV.

λ (nm)	INTENSIDADE RELATIVA (%)			
	EUP-padrão	EUP-CCD	EUP-ET	EUP-ETP
-342	100,00	100,00	100,00	100,00
-276	71,69	70,92	78,34	76,09
-254	69,86	68,79	76,77	74,72
-243	72,14	71,16	86,61	84,24

TABELA 37 - Intensidade relativa percentual de 3-0-metilquercetina (3MQ) no UV.

λ (nm)	INTENSIDADE RELATIVA (%)			
	3MQ-padrão	3MQ-CCD	3MQ-ET	3MQ-ETP
-255	100,00	100,00	100,00	100,00
-267sh	89,18	91,04	88,39	89,37
-358	92,26	85,07	75,72	82,67

As curvas padrão da 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP), seja através do UVdireto ou CCD/UV, foram determinadas a 358 e 342nm respectivamente, observando-se linearidade entre absorvância e concentração na faixa de 0,005 a 0,020mg/ml para 3MQ e 0,004 a 0,020mg/ml para EUP (Figuras 25 e 26). As Tabelas 17 e 18 mostram os valores médios obtidos experimentalmente tanto no UVdireto como na CCD/UV. Nas absorvâncias do método CCD/UV para 3MQ, o terceiro valor com coeficiente de variação porcentual (CV%) 5,04 não prejudicou a linearidade da curva, não sendo necessário corrigir os valores. O mesmo acontece no método CCD/UV para a EUP, onde o primeiro e segundo valores apresentam CV% de 4,67 e 4,40 respectivamente, no entanto sem prejudicar a linearidade da curva, dada serem estas diferenças estatisticamente aceitas para $\alpha = 0,001$.

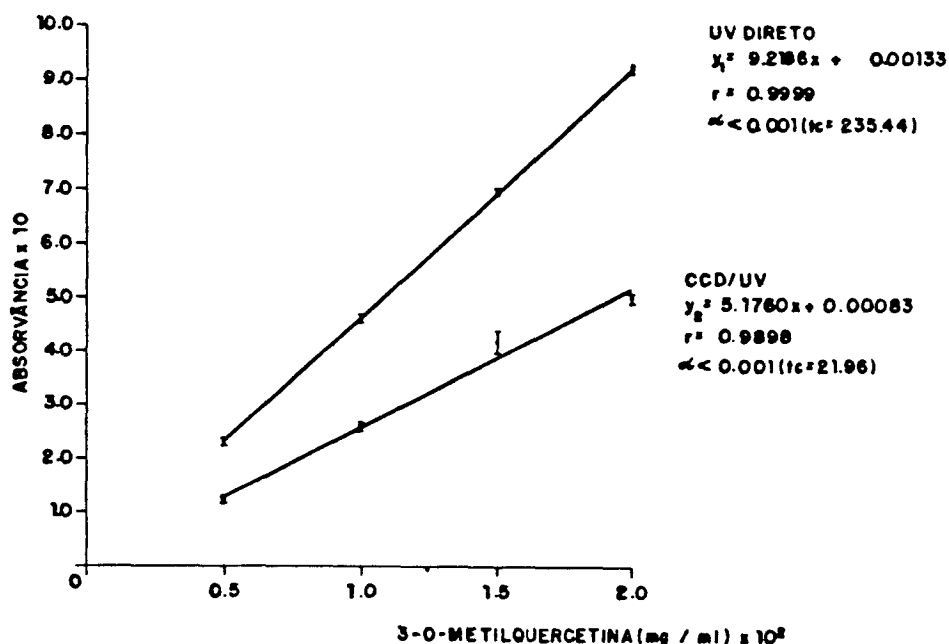


FIGURA 25 - Curvas padrão de 3-0-metilquercetina no UV a 358nm.

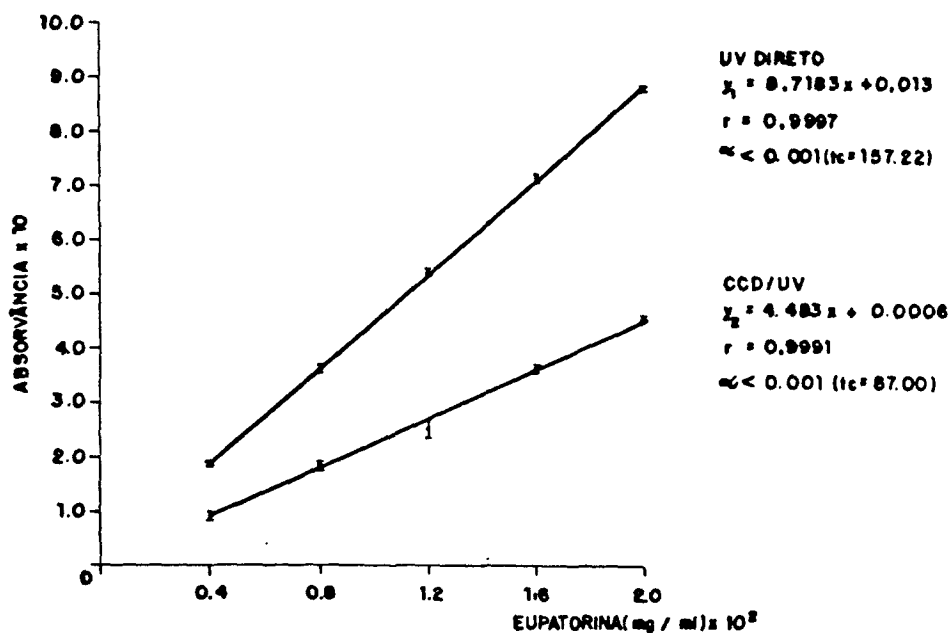


FIGURA 26 - Curvas padrão de eupatorina no UV a 342nm.

Da comparação entre as retas obtidas pelas duas técnicas de quantificação tanto para a 3MQ como para a EUP nota-se que para a mesma concentração de partida obtêm-se um valor cerca de 44% menor para a 3MQ e cerca de 50% menor para a EUP quando dosadas por CCD/UV. Esta diferença é devida a perda do método que é influenciada pelos seguintes fatores: 1) retenção da substância na sílica e 2) retirada incompleta da mancha pela delimitação da área de raspagem. Devido a estes fatores, é importante aplicar junto, na análise dos extratos, um padrão para evitar estes erros. A aplicação de volumes diferentes do padrão e/ou dos extratos em análise pode provocar erros que não

são passíveis de correção, a não ser por nova aplicação. Esta relação permanece constante mesmo com o aumento da concentração existindo uma correlação altamente significativa ($\alpha = 0,001$) entre o quociente das absorvâncias e a concentração. A reprodutibilidade do método é aceitável considerando-se para os padrões 3MQ e EUP coeficientes de variação médio de 3,48% e 2,71% respectivamente, para $n = 12$ e 15 (Figura 27).

As diferenças observadas nas concentrações de 3MQ e de EUP entre os extratos e extratos purificados, de 17,63% para 3MQ e 21,13% para EUP, demonstra que a purificação do extrato conduz a perda de substância. Considerando este problema, a opção pela purificação justifica-se através da eliminação de substâncias de polaridade extrema que viriam a interferir a análise cromatográfica.

A análise estatística da reprodutibilidade reforça a opção feita. Enquanto que os coeficientes de variação médio para 3MQ e EUP dos extratos e extratos purificados (respectivamente 3,67% e 2,14%) não diferem significativamente dos resultados dos padrões, os $\overline{CV\%}$ entre os extratos (4,49) e extratos purificados (1,31) diferem estatisticamente entre si, demonstrando a menor reprodutibilidade dos valores resultantes do doseamento CCD/UV.

A eliminação de interferentes através do fracionamento do extrato por cromatografia em coluna segundo preconiza STRACK & KRAUSE (1978) foi rejeitada face ao consumo excessivo de tempo e de solventes.

Embora a quantificação por CCD/UV tenha comprovado a sua aplicabilidade nas condições estudadas neste trabalho, é necessária sua validação por outro método com a finalidade de verificar sua exatidão e reprodutibilidade (TYMAN, 1978; JONG

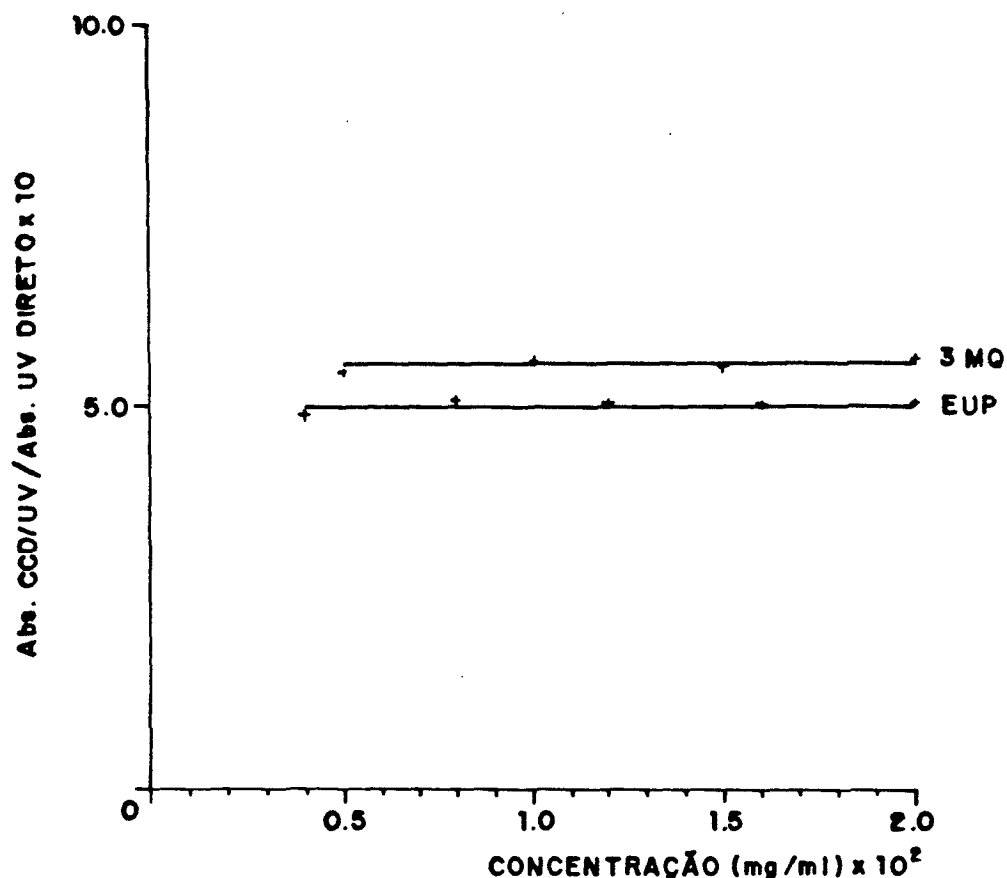


FIGURA 27 - Relação entre absorvância do padrão e absorvância do padrão após eluição da sílicagel.

et alii, 1978; SRIVASTAVA & KISHORE, 1985).

Com o intuito de validação de metodologia optou-se pela CLAE que se caracteriza por sua reprodutibilidade, sensibilidade e exatidão (GALENSA & HERRMANN, 1980; ASEN, 1984; McNAIR & LANÇAS, 1985; DI BUSSOLO, 1986).

Para a quantificação por CLAE utilizou-se da comparação com padrão externo em técnica isocrática, coluna de fase reversa (RP-18) e fase móvel hidrometanólica acidificada com ácido fosfórico a 1%, dificultando a ionização de grupamentos ácidos para evitar anomalias nos picos (assimetria) como 'tailing' ou

'fronting' (HAMILTON & SEWELL, 1977; MEYER, 1979a), conforme desenvolvido quando da análise qualitativa (Figuras 11 e 18 e Tabela 14).

A linearidade das curvas padrão de 3-0-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP) entre as suas concentrações e as áreas dos picos (Tabelas 20 e 21) foi comprovada através da correlação significativa ($\alpha < 0,001$) para as faixas de 0,05 a 0,40mg/ml para 3MQ e de 0,0512 a 0,800mg/ml para EUP (Figuras 28 e 29).

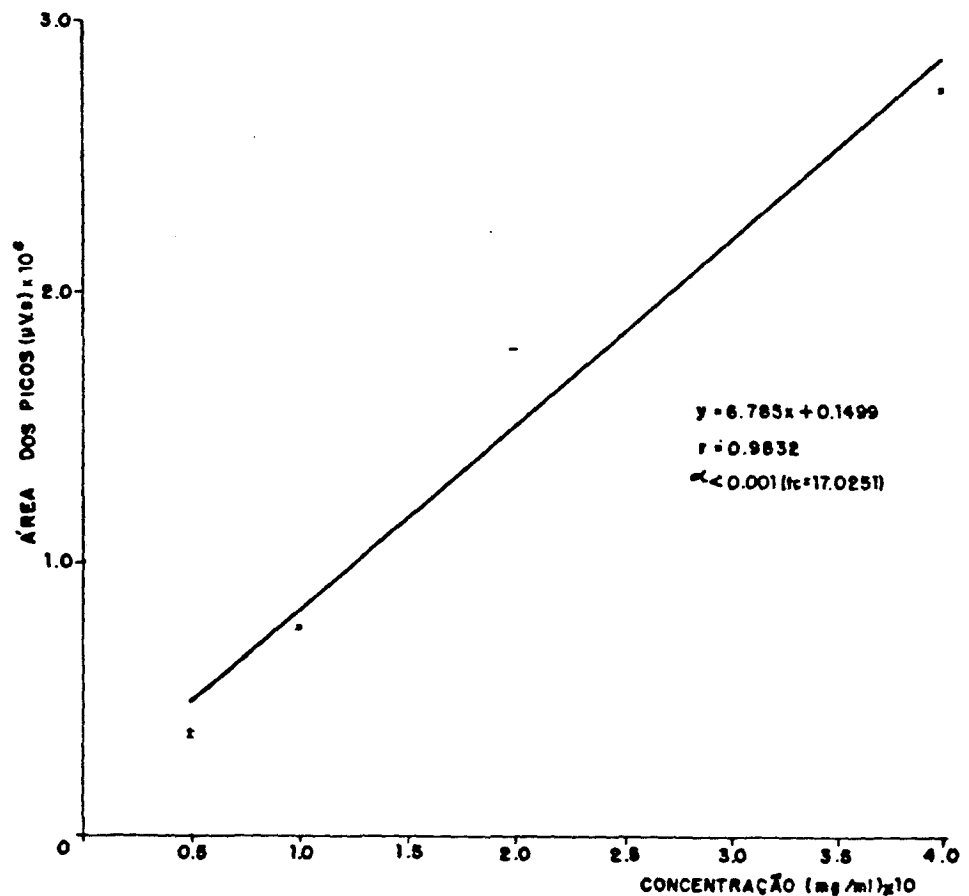


FIGURA 28 - Curva padrão de 3-0-metilquercetina (3MQ) por CLAE.

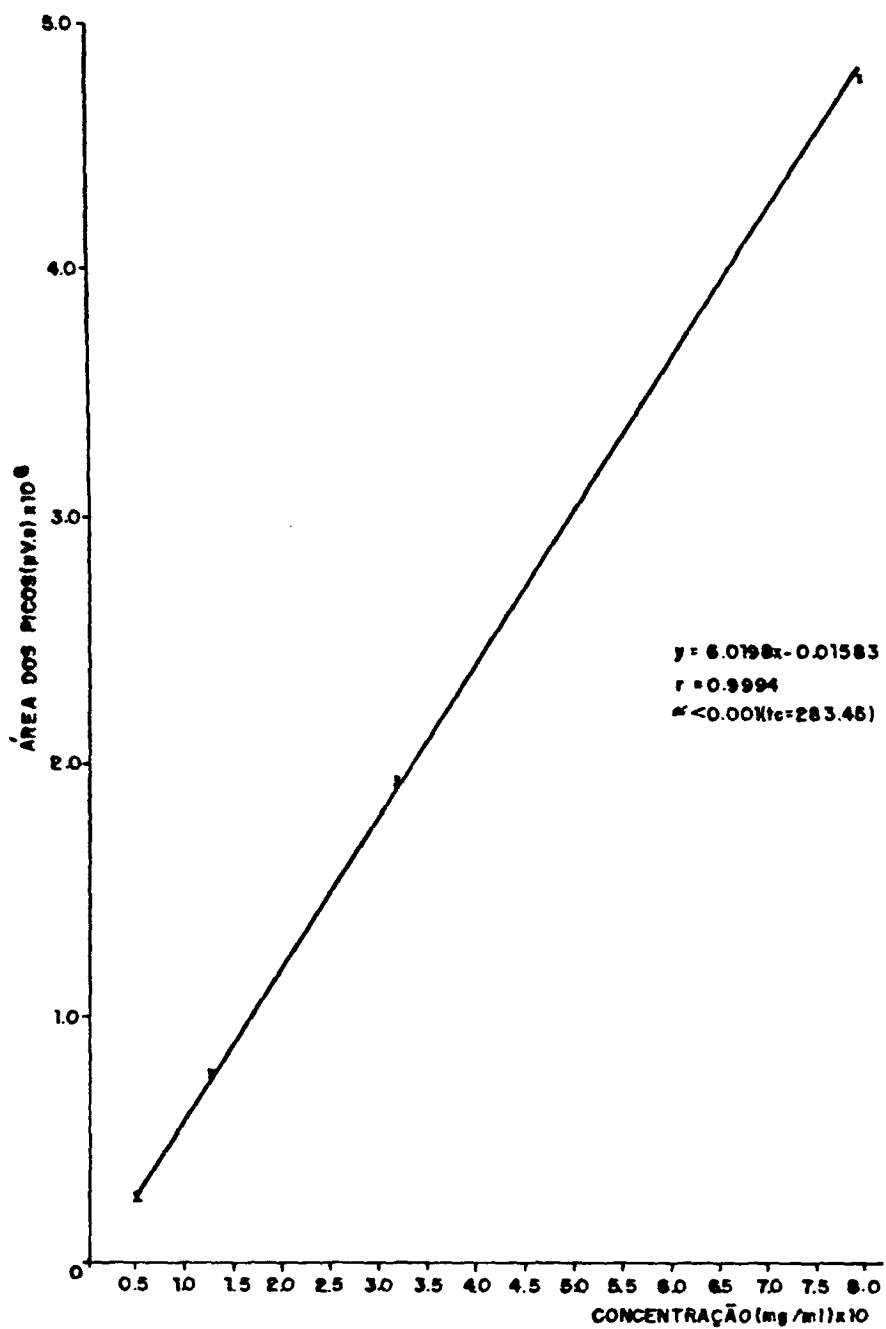


FIGURA 29 - Curva padrão de eupatorina (EUP) por CLAE.

Para a avaliação da influência do tempo de maceração, da concentração etanólica da mistura extratora e da distribuição granulométrica sobre as características dos macerados contendo 10% (m/V) de partes aéreas de *Baccharis trimera* foi empregada a análise fatorial do tipo 2^n (Figura 30). As vantagens e desvantagens deste método de experimentação foram discutidas no capítulo de introdução deste trabalho (página 9).

Para avaliação foram consideradas as seguintes características dos extratos: teor etanólico, resíduo seco total, resíduo seco purificado e as concentrações de 3-O-metilquercetina e eupatorina.

A análise dos dados obtidos diretamente da forma padrão (Tabela 29 e Figura 30) permite uma avaliação inicial do tipo dos efeitos e de suas interações.

Embora, o valor do pH não seja uma característica determinante da eficiência de extração, serve, indiretamente, como um indicativo da qualidade do produto.

Era de se esperar entretanto, que ocorresse uma redução do pH da micela, mas a falta de um estudo da estabilidade prejudica e reflete-se sobre esta característica.

O teor etanólico dos extratos é influenciado pelos fatores analisados. Como as macerações foram realizadas em recipientes fechados exclui-se que as condições do meio ambiente tenham exercido algum efeito. Na procura de uma explicação nestes sistemas fechados, aceita-se a passagem da água residual contida no material vegetal para o meio extrativo. Se tal fato for real um aumento do tempo de contato entre a droga e o sistema extrator deverá conduzir a uma diminuição do teor etanólico na micela. O efeito calculado para o tempo de maceração (E_A)

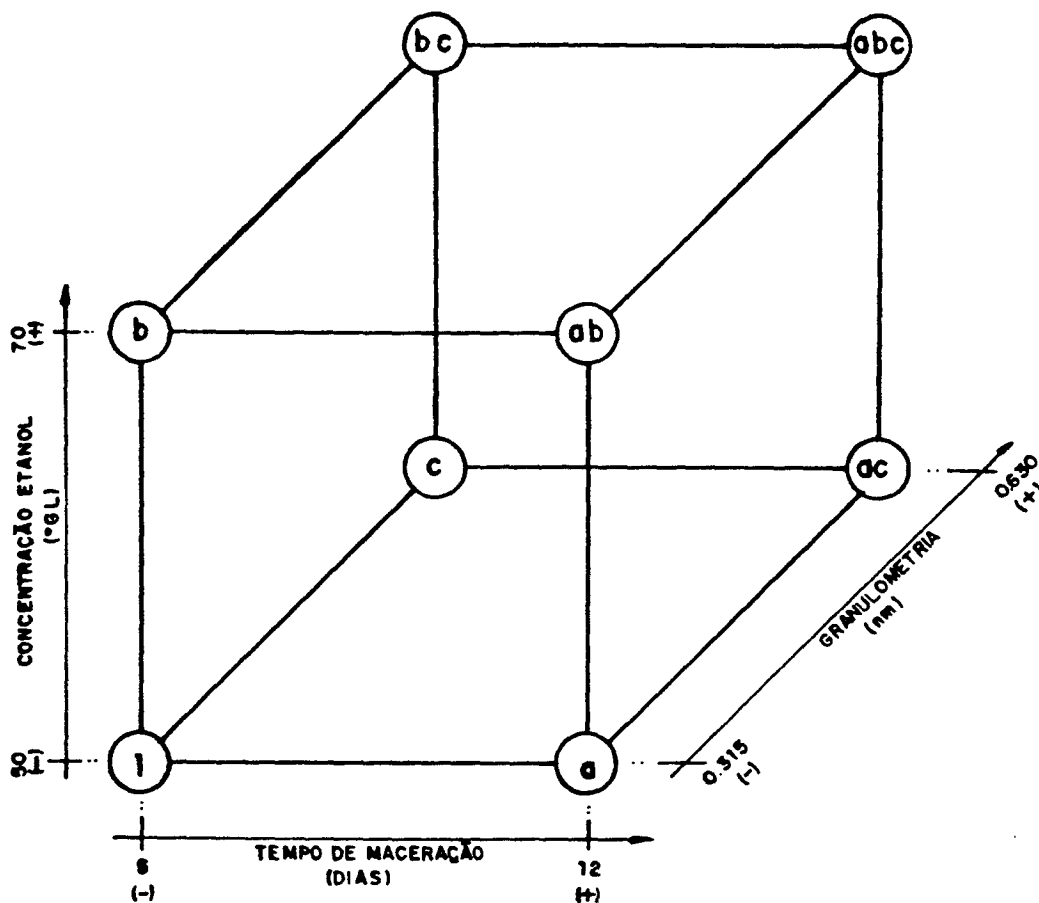


FIGURA 30 - Projeto fatorial ortogonal do tipo 2^3 das substâncias 3MQ e EUP, obtidas por CLAE, dos macerados purificados (MCP).

veio a confirmar esta explicação. Já os demais efeitos não têm significado com relação ao efeito do tempo de maceração sobre esta característica.

A análise estatística demonstra também, que a influência do tempo de maceração é cerca de 12 vezes menor do que a influência da concentração etanólica do líquido extrator, indicando a necessidade de cuidados especiais durante o período de extração, quanto a manutenção do teor alcoólico desejado do produto.

A maior ou menor quantidade de substâncias obtidas na análise do resíduo seco total (RST) se refere a maior facilidade

de delas passarem ao líquido extrator. Para que isto ocorra é necessário levar em consideração 5 fatores básicos: 1º) tamanho das partículas (granulometria); 2º) características do líquido extrator; 3º) tempo de extração; 4º) temperatura de extração e 5º) solubilidade das substâncias no líquido extrator. Destes fatores enumerados, 3 estão em análise (1º, 2º e 3º).

Pode-se observar pela Tabela 29 que a diminuição do fator granulometria (E_C) é determinante para o rendimento do RST, confirmando que a eficiência da extração sólido-líquido, que no caso de drogas vegetais, ocorre através da lixiviação das células fraturadas e da permeação através da parede celular, cresce com a diminuição do tamanho das partículas, isto é, com o aumento da sua área específica.

A diminuta influência dos fatores concentração etanólica do mênstruo (E_B) e tempo de maceração (E_A) indica respectivamente, que a gama de substâncias extraídas não é afetada quantitativamente pela polaridade da mistura extratora e que o equilíbrio da concentração do soluto na micela e no interior das células foi alcançado.

O efeito predominante da granulometria determina também o sentido e a grandeza das interações AC e BC, o que é possível comprovar comparando-se com o resultado obtido para a interação AB, que não possui significado sobre o rendimento de substâncias extraídas.

O resíduo seco purificado (RSP) obtido através do tratamento do resíduo seco total (RST) sofre igualmente influência dos fatores galênicos estudados. Como pressupõe-se que a purificação conduziu a uma seleção dos componentes extraídos, dando-se ênfase aos produtos de polaridade média, espera-se ter uma

visão mais real da eficiência da extração deste tipo de substância. Os fatores mais significantes, que conduziram ao aumento do RSP, foram o prolongamento do tempo de maceração (E_A) e a diminuição da granulometria (E_B), indicando respectivamente, que o equilíbrio entre a concentração destas substâncias extraídas na micela e no material vegetal é alcançado com a extensão do tempo de contato e que a superfície específica tem igual importância no rendimento. O diminuto efeito da concentração etanólica no RST (E_B) indica, por sua vez, que, devido a polaridade das substâncias contidas na droga, a extração não é afetada nesta faixa de polaridade das misturas solventes.

O rendimento de 3-0-metilquercetina (3MQ) é dependente dos três fatores estudados, sendo que a intensidade maior é devida ao efeito da granulometria (E_C) seguindo-se o tempo de maceração (E_A) e o efeito da concentração etanólica (E_B). As interações possuem importância secundária sobre este parâmetro, possuindo quase o mesmo significado. O efeito negativo do aumento da concentração etanólica sobre a extensão do rendimento de 3-0-metilquercetina está de acordo com sua polaridade, isto é, de acordo também com a polaridade do solvente.

Já para a eupatorina (EUP) houve um comportamento parcialmente diferenciado da 3-0-metilquercetina. O efeito da granulometria (E_C) foi predominante, possuindo quase duas vezes a intensidade do efeito do tempo de maceração (E_A). Já a alteração da concentração etanólica não conduziu a modificações significativas na concentração de EUP. Já foi discutido quando da avaliação da análise dos extratos por CLAE sobre o caráter sensivelmente menos polar de EUP com relação a 3MQ, o que explicaria o comportamento daquela substância com rela-

ção aos sistemas extratores.

Face a estas observações, pode-se notar que as interações ganham em importância na avaliação estatística e aqui especialmente a interação binária BC e ternária são as de maior importância, reforçando a falta de dependência entre a faixa de polaridade escolhida para a mistura solvente e o rendimento de EUP.

Na avaliação dessas concentrações pelo método de Tukey (método T) analisando-se dois a dois os valores estimados obtidos das Tabelas 4 e 34 e equações 15 e 16, para a 3MQ, observa-se que os efeitos e/ou interações entre $\hat{a} - \hat{abc}$, $\hat{ab} - \hat{ac}$ e $\hat{bc} - \hat{abc}$ não se mostraram superiores uns aos outros. Que entre os efeitos e/ou interações $\hat{a} - \hat{bc}$, $\hat{b} - \hat{bc}$, $\hat{b} - \hat{abc}$, $\hat{ab} - \hat{bc}$, $\hat{ab} - \hat{abc}$, $\hat{c} - \hat{ac}$, $\hat{c} - \hat{bc}$, $\hat{c} - \hat{abc}$, $\hat{ac} - \hat{bc}$ e $\hat{ac} - \hat{abc}$, sempre os segundos valores estimados foram melhores que os primeiros e para todas as outras interações os primeiros valores foram superiores aos segundos.

Já na avaliação que se faz para a EUP (equações 15 e 16 e Tabelas 4 e 35), demonstra-se que somente em duas situações não existe superioridade de uma interação sobre outra ($\hat{ab} - \hat{ac}$ e $\hat{bc} - \hat{abc}$). Em 11 casos os efeitos e/ou interações, os segundos valores mostram-se superiores sobre os primeiros valores estimados ($\hat{a} - \hat{bc}$, $\hat{a} - \hat{abc}$, $\hat{b} - \hat{bc}$, $\hat{b} - \hat{abc}$, $\hat{ab} - \hat{bc}$, $\hat{ab} - \hat{abc}$, $\hat{c} - \hat{ac}$, $\hat{c} - \hat{bc}$, $\hat{c} - \hat{abc}$, $\hat{ac} - \hat{bc}$, $\hat{ac} - \hat{abc}$) e nas outras situações todos os primeiros valores estimados são superiores aos segundos.

Na análise feita portanto, pode-se avaliar o efeito e/ou interação entre dois extratos na verificação das concentrações obtidas. Entretanto como se aplicam valores estimativos,

no método T, os cálculos pela forma padrão tornam-se mais reais para análise, com a desvantagem de não poderem ser avaliadas duas situações ao mesmo tempo (o que faz o método T).

A forma padrão também não permite extrapolar a análise para uma terceira situação, isto é, generalizar dizendo que uma diminuição mais intensa da granulometria levará a um maior rendimento, tendo validade somente na região estudada.

Os valores apresentados pelo método de Tukey (método T) (Tabelas 34 e 35) confirmam, com menor grau de exatidão, a validade da forma padrão como o método mais recomendado na análise dos efeitos e/ou interações (DAVIES, 1956; BOX et alii, 1978; MONTGOMERY, 1984).

Embora estes dados possibilitem a visualização numérica dos efeitos e interações dos fatores sobre as características dos extratos, as observações precisam ser validadas através de teste de significância. Para tanto centrou-se a análise estatística nos rendimentos de 3-O-metilquercetina (3MQ) e eupatorina (EUP).

Antes da aplicação destes testes foram verificadas algumas dúvidas sobre o relacionamento entre o resíduo seco total (RST), resíduo seco purificado (RSP) e as concentrações dos flavonóides marcadores.

O teste de correlação experimentado para RST/3MQ e RST/EUP (Tabelas 25, 27 e 28) demonstrou ser não significativo ($t_{\text{calc}} = 1,1466$ e $1,0142$, respectivamente para 3MQ e EUP) para um valor de $t_{0,05;7} = 2,365$.

Da mesma maneira avaliou-se o comportamento para a correlação RST/RSP (Tabelas 25 e 26) obtendo-se um valor de $1,1044$ para t demonstrando não haver correlação entre eles para

$$t_{0,05;7} = 2,365.$$

A falta desta correlação, entre o resíduo seco total (RST) e as concentrações das substâncias marcadoras 3-O-metil-quercetina e eupatorina, indicam que, devido ao espectro dos compostos extraídos, a sua utilização não é adequada como método indicativo ou prévio de quantificação das mesmas. Com o objetivo de melhorar a seletividade de extração e possibilitar um método de quantificação mais simples, foi feita a purificação do RST, através do tratamento com acetato de etila e clorofórmio (Figura 3). Na Figura 7 fica demonstrado que o emprego deste procedimento eliminou muitas das substâncias presentes, preservando, no entanto os compostos de interesse.

No entanto o estudo da distribuição t de Student demonstrou ser significativa a correlação RSP/3MQ e RSP/EUP (Tabelas 26, 27 e 28) com valores calculados para t de 6,4375 e 4,6361, respectivamente, para $t_{0,01;7} = 3,499$, sugerindo que o emprego da determinação do RSP pode ser aceito como método de avaliação prévia ou indicativo da concentração dos dois flavonóides no controle de qualidade (Figuras 3 e 31).

Com as análises da Tabela 29 feitas anteriormente, vale destacar que a aplicação do método de GRUBBS, que detecta a presença de resíduos que se encontram fora da distribuição normal de uma população, não apresentou nenhum resíduo suspeito ou fora da normalidade para as concentrações de 3MQ ou EUP, o que vale dizer que todas as análises estatísticas realizadas estão validadas por este método, no que se refere aos dados tabulados pela análise de variância.

De posse destas informações e considerando-se a concentração de 3MQ, determinada por CLAE, o macerado mais apro-

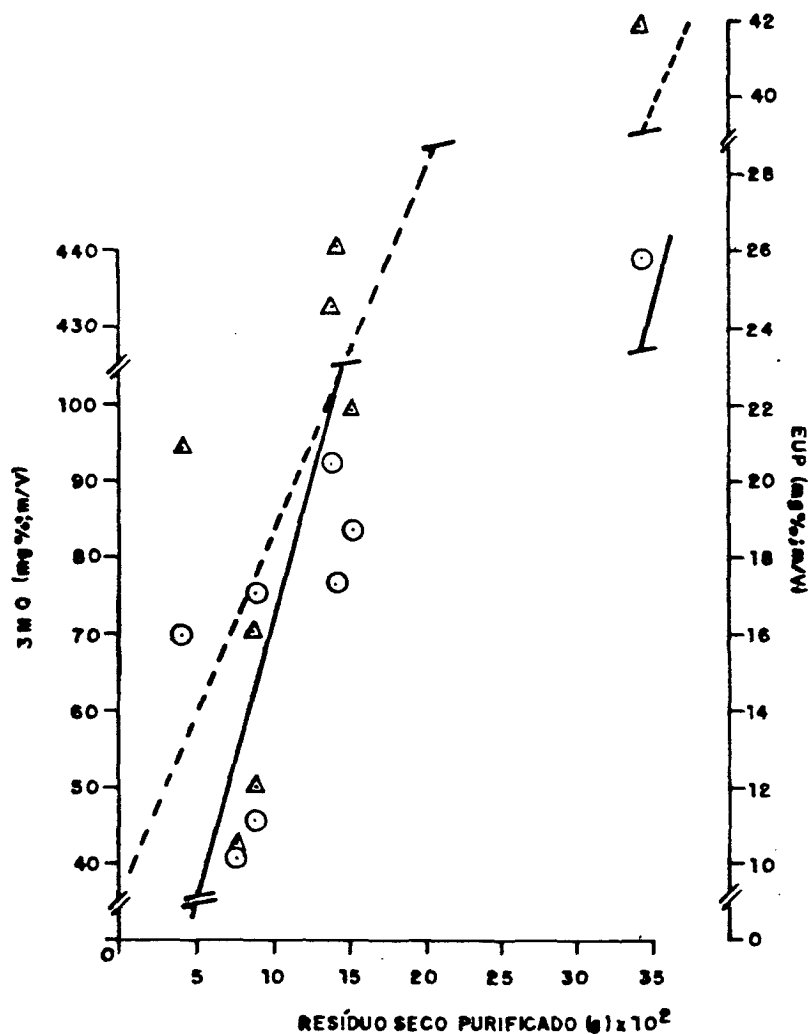


FIGURA 31 - Correlação entre o resíduo seco purificado (RSP) e as concentrações de 3-0-metilquercetina (3MQ) (—○—) e eupatorina (EUP) (--Δ--) dos macerados. (Para 3MQ $y = 1328,85 - 61,61x$, $r = 0,9346$, $t_{\text{calc}} = 6,4375$; para EUP $y = 94,59 + 9,12x$, $r = 0,8841$, $t_{\text{calc}} = 4,6361$).

priado corresponde ao experimento número 2 obtido com 12 dias de maceração, mistura extratora hidroalcoólica a 50%, partindo-se da droga de faixa granulométrica de 0,400-0,315mm.

Observa-se que o E_B para EUP (Tabelas 29 e 32), não é significativo, embora sendo positivo, logo a concentração etanólica não influencia no rendimento de EUP. A Tabela 28 denota a maior concentração para o experimento número 2, que estatisticamente está comprovado e não é um valor fora da normalidade (método de GRUBBS).

Baseado nestas informações e objetivando-se rendimento de EUP, o melhor resultado foi obtido no experimento 2, correspondendo a maceração por 12 dias, com etanol a 50%, da droga de faixa granulométrica 0,400-0,315mm.

Com os resultados e análise crítica destes, espera-se poder servir de auxílio na preparação de formas farmacêuticas derivadas de *Baccharis trimera* (Less.) DC..

Face as potencialidades do emprego terapêutico e o uso difundido na medicina popular de *Baccharis trimera* (carqueja) este trabalho procurou, ao avaliar a metodologia disponível, verificar a sua adequabilidade quanto ao aspecto físico-químico e tecnológico.

Esta dissertação, que apresenta suas limitações intrínsecas, ligadas principalmente quanto ao tempo de execução e a restrições quanto à abrangência do tema, procura através de seus resultados, servir de base e estímulo a novas pesquisas complementares. Faz-se mister analisar o vegetal durante seu ciclo vegetativo, comparando as variações decorrentes do local de coleta, avaliar a atividade farmacológica e determinar sua estabilidade, a fim de conceder à droga ou seus preparados a segurança de uso condizente.

5. CONCLUSÕES

- Os extratos das partes aéreas floridas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. podem ser caracterizados pelas cromatografias em camada delgada, líquida de alta eficiência e líquida a vácuo pelos constituintes flavonoídicos: 3-O-metilquercetina e eupatorina.

- O óleo essencial presente nas partes aéreas pode auxiliar na caracterização da matéria-prima vegetal, através da cromatografia em camada delgada.

- A decocção não mostrou ser um método de extração adequado para as substâncias 3-O-metilquercetina e eupatorina.

- A presença do flavonol 3-O-metilquercetina contribui ao estudo químico dos flavonóides encontrados no gênero e espécie.

- Por terem apresentado sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade, os métodos de quantificação - cromatografia em camada delgada associada à espectrometria no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram viabilidade quanto a aplicação.

- A obtenção de macerados otimizados pode ser feita utilizando-se análise fatorial, procurando adequar antes do planejamento, as condições de processamento.

- A demonstração de existência de correlação entre resíduo seco purificado 3-O-metilquercetina e eupatorina demons-

tra que a determinação do resíduo seco purificado é adequada como método quantitativo para estes dois flavonóides.

- Para os macerados contendo 10% (m/V) das partes aéreas, as condições otimizadas para 3-O-metilquercetina foram: 12 dias de maceração, 50% de etanol no líquido extra-
tor, 0,400-0,315mm de granulometria.

- Para os macerados contendo 10% (m/V) das partes aéreas, as condições otimizadas para eupatorina foram: 12 dias de maceração, 50% de etanol, 0,400-315mm de granulometria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALONSO, E.; ESTRELLA, M.I.; REVILLA, E. HPLC separation of flavonol glycosides in wines. Chromatographia, 22(7/12):268-70, 1986.
- 2 ALVAREZ, M. & KUSUMOTO, I.T. Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da *Stevia rebaudiana* e dos seus produtos de hidrólise através da HPLC. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 30(2):337-48, 1987.
- 3 ARAÚJO, R.D. de. Contribuição ao estudo farmacognóstico da *Baccharis riograndensis* Teodoro & Vidal. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia da URGs, 1957. 64p. Tese de Doutorado.
- 4 ASEN, S. High performance liquid chromatography analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. Phytochemistry, 23(11):2523-6, 1984.
- 5 BARROSO, G.M. Subtribo *Baccharidinae* Hoff. . Rodriguésia, 28(40):19-188, 1976.
- 6 BAUER, L.; SILVA, G.A.A.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; BACHA, C.T.M.; SANT'ANA, B.M.S. Os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. Revista do Centro de Ciências da Saúde, 6(3/4):7-12, 1978.
- 7 BERNHARD, H. Neuere Aspekte der Arzneipflanzenextraktion. Schweizerische Apotheker Zeitung, 118(22):555-7, 1980.

- 8 BÖHME, H. & HARTKE, K. Deutsches Arzneibuch-8. Ausgabe 1978- Kommentar. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1981. p.15-6.
- 9 BÖHME, H. & HARTKE, K. Deutsches Arzneibuch-8. Ausgabe 1978- Kommentar. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1981a. p.43-105.
- 10 BOLTON, S. Factorial designs in pharmaceutical stability studies. Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(4):362-6, 1983.
- 11 BONATI, A. Medicinal plants and industry. Journal of Ethnopharmacology, 2:167-71, 1980.
- 12 BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York, J.Wiley, 1978. p.306-24.
- 13 BRITISH Pharmacopoeia. 13.ed. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.108-11.
- 14 BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. Deutscher Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, GOVI - Deutscher Apotheker, 1979. Codex - Probe 12. v.1, t.1, p.14.
- 15 BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. Deutscher Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, GOVI - Deutscher Apotheker, 1979a. Holunderblüten. v.2. Ergänzung, 81. pag. irreg.
- 16 CABRERA, A.L. Compositae. In: BURKART, A. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Buenos Aires, INTA, 1974. p.118-256.
- 17 CENTRAL DE MEDICAMENTOS. 1 Encontro nacional de assistência farmacêutica e política de medicamentos. Brasília, Coordenadoria de Comunicação Social da CEME, 1988. 43p.

- 18 COLL, J.C. & BOWDEN, B.F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. Journal of Natural Products, 49(5):934-6, 1986.
- 19 DÄRR, A. Elementos de tecnologia farmaceutica. Zaragoza, Acribia, 1979. 121p.
- 20 DAVIES, O.L. ed. The design and analysis of industrial experiments. 2.ed. New York, Hafner, 1956. p.247-89.
- 21 DAVYDOV, V.Ya.; ELIZALDE GONZALEZ, M.; KISELEV, A.V. High-performance liquid chromatography of cardiac glycosides. Journal of Chromatography, 204:293-301, 1981.
- 22 DÉVAY, A. & RÁCZ, I. Examination of parameters determining particle size of sulfamethoxazole microcapsules prepared by a new meltdispersion method. Pharmaceutical Industry of Yugoslavia, 46(1):101-3, 1984.
- 23 DI BUSSOLO, J.M. The use of P-E TSK size-exclusion columns for biopolymers separations. Liquid Chromatography Technical Bulletin, 2:1-14, 1986.
- 24 DINÇER, S & ÖZDURMUŞ, S. Mathematical model for enteric film coating of tablets. Journal of Pharmaceutical Sciences, 66(8):1070-3, 1977.
- 25 DOLEJS, L.; HEROUT, V.; ŠORM, F. Sesquiterpenic compounds of *Baccharis genistelloides* Pers.; structure of palustrol. Collection Czechoslovak Chemical Communications, 26:811-7, 1961.
- 26 EUROPEAN Pharmacopoeia. Saint -Ruffine, Maisonneuve, 1969. v.1.
- 27 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977. p.934-5.
- 28 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977a. p.939-42.

- 29 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977b. p.945.
- 30 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977c. p.988.
- 31 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977d. p.1166-7.
- 32 FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p.331-2.
- 33 FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo, Siqueira, 1959a. p.946-8.
- 34 FARNSWORTH, N.R. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. Foro Mundial de la Salud, 6(1):89-94, 1985.
- 35 FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization, 63(6):965-81, 1985a.
- 36 FEHR, D. Veränderung des Menthon-und Mentholgehaltes in Pfefferminzblättern während der Lagerung. Pharmazeutische Zeitung, 129(17):990-1, 1984.
- 37 GALENSA, R. & HERRMANN, K. Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 189(2):217-24, 1980.
- 38 GUPTA, B.C. & MATHAI, A.M. Regression and analysis of variance techniques. Rio de Janeiro, Instituto de Matemática-UFRJ, 1980. cap.7, p.368-81.
- 39 GUYTON, A.C. Tratado de fisiologia médica. 5.ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1977. p.739-43.

- 40 HALBACH, G. Grenzen der Analytik pflanzlichen Arzneibereitung. Deutsche Apotheker Zeitung, 123(14):668-71, 1983.
- 41 HAMILTON, R.J. & SEWELL, P.A. Introduction to high performance liquid chromatography. London, Chapman & Hall, 1977. p.12-6.
- 42 HAMILTON, R.J. & SEWELL, P.A. Introduction to high performance liquid chromatography. London, Chapman & Hall, 1977a. p.27-31.
- 43 HELMAN, J. Farmacotecnia teorica y practica. 3.ed. Mexico, Continental, 1982. v.4, p.1147-87.
- 44 HERZ, W.; PILOTTI, A-M.; SÖDERHOLM, A-C.; SHUHAMA, I.K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. Journal of Organic Chemistry, 42(24):3913-7, 1977.
- 45 IWU, M.M.; IGBOKO, O.A.; ONWUCHEKWA, U.A.; OKUNJI, C.O. Evaluation of the antihepatotoxic activity of the biflavonoids of *Garcinia kola* seed. Journal of Ethnopharmacology, 21:127-38, 1987.
- 46 JONG, J. de; VAN NIEUWKERK, H.J.; SCHOLTEN, A.H.M.T.; BRINKMAN, U.A.Th.; FREI, R.W. Comparative study of high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography for the determination of metoxuron and its by-products in formulations. Journal of Chromatography, 166:233-44, 1978.
- 47 LARINI, L. Toxicologia. São Paulo, Manole, 1987. p.103-11.
- 48 LEBRETON, P.; JAY, M.; VOIRIN, B. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. Chimie Analytique, 49(7):375-83, 1967.

- 49 LEUENBERGER, H. & BECHER, W. A factorial design for compatibility studies in preformulation work. Pharmaceutical Acta Helvetiae, 50(4):88-91, 1975.
- 50 LIST, P.H. & SCHMIDT, P.C. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.56-67.
- 51 LÖHDEFINK, J. Untersuchungen zur Flavonoidführung einiger *Passiflora*-Arten. Deutsche Apotheker Zeitung, 116(16):557-60, 1976.
- 52 MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The two-dimensional paper chromatographic analysis of flavonoids. In:__. The systematic identification of flavonoids. Berlin, Springer, 1970. cap.1, p.14.
- 53 MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The two-dimensional paper chromatographic analysis of flavonoids. In:__. The systematic identification of flavonoids. Berlin, Springer, 1970a. cap.5, p.41-73.
- 54 MACERATION and percolation. The Flavor Industry, jul.: 449-51, 1970.
- 55 MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J.; VOIRIN, B. 3-O-methylquercetin 7-O-diglucoside 4'-O-glucoside from the fern, *Ophioglossum vulgatum*. Phytochemistry, 8:469-72, 1969.
- 56 MARKHAM, K.R. Isolation techniques for flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. The flavonoids. New York, Academic, 1975. v.1, cap.1, p.1-44.
- 57 MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. The flavonoids. New York, Academic, 1975a. v.1, cap.2, p.45-61.
- 58 MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. London, Academic, 1982. p.31-4.

- 59 McNAIR, H.M. & LANÇAS, M.S.G. e F. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Revista de Química Industrial, (643):21-6, 1985.
- 60 MENßEN, H.G. Standardisierung und Zubereitungsformen von Phytopharmaka. Pharmazeutische Zeitung, 124(6):233-6, 1979.
- 61 MENßEN, H.G. Standardisierung von Phytopharmaka. Deutsche Apotheker Zeitung, 121(4):1255-9, 1981.
- 62 MERCK, E. ed. Dyeing reagents for thin-layer and paper chromatography. Darmstadt, Merck, 1971. 118p.
- 63 MEYER, V. Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie. Frankfurt, Diesterweg, 1979. p.17-8.
- 64 MEYER, V. Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie. Frankfurt, Diesterweg, 1979a. p.25-6.
- 65 MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 2.ed. New York, J.Wiley, 1984. p.274-9.
- 66 NAVES, Y-R. Études sur les matières végétales volatiles CLXI¹) Présence de lédol dans l'huile essentielle de carquéja. Helvetica Chimica Acta, 42:1996-8, 1959.
- 67 NAVES, Y-R. Études sur les matières végétales volatiles CLIX(I). Sur l'huile essentielle de carquéja de l'Etat de Santa Catarina (Brésil). Bulletin Société Chimique, :1871-9, 1959a.
- 68 NEARING, M. La farmacia verde medicinas. El Cid Informa, 14(1):10-1, 1985.
- 69 NEWTON, J.M.; ROWLEY, G.; TÖRNBLOM, J-F.V. Further studies on the effect of additives on the release of drug from hard gelatin capsules. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 23(supl.):156-160, 1971.

- 70 OSOL, A. ed. Remington's Pharmaceutical Science. 16.ed. Easton, Mack, 1980. cap.83, p.1461-2.
- 71 PAL, S.C. & NANDY, A. Effect of dilute alcohol, duration of maceration and pH of the total solid contents in the preparation of tincture of *Eugenia jambolana* Lam. (fam. Myrtaceae). Research and Industry, 28:32-4, 1983.
- 72 PAVAN, A.G. *Baccharis trimera* Less. (carqueja amarga) uma planta da medicina popular brasileira. Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo, 10:205-14, 1952.
- 73 PELLETIER, S.W.; CHOKSHI, H.P.; DESAI, H.K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. Journal of Natural Products, 49(5):892-900, 1986.
- 74 PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 1.ed. São Paulo, Nacional, 1929. p.186-7.
- 75 REVILLA, E.; ALONSO, E.; ESTRELLA, M.I. Analysis of flavonol aglycones in wine extracts by high-performance liquid chromatography. Chromatographia, 22(1/6):157-9, 1986.
- 76 RIBÉREAU-GAYON, P. Les composés phénoliques des végétaux. Paris, Dunod, 1968. p.71-76.
- 77 RITCHIE, J.M. The aliphatic alcohols. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. ed. The pharmacological basis of therapeutics. 7.ed. New York, MacMillan, 1985. p.372-86.
- 78 RIZK, A.M. Constituents of plants growing in Qatar. I. A chemical survey of sixty plants. Fitoterapia, 53(1/2):35-9, 1982.
- 79 SANTOS FILHO, D. dos. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Baccharis trimera*. Ações farmacológicas

- das substâncias isoladas. Ribeirão Preto, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1979. 117f. Tese de Livre Docência.
- 80 SCHILCHER, H. Die Kamille: Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1987.
- 81 SCHUSTER, R. Separation and positive identification of compounds in complex sample mixtures using on-line, LC-UV/VIS and LC-MS, direct coupling techniques. Chromatographia, 13(7):379-85, 1980.
- 82 SCHWARTZ, J.B.; FLAMHOLZ, J.R.; PRESS, R.H. Computer optimization of pharmaceutical formulations I: General procedure. Journal of Pharmaceutical Sciences, 62(7):1165-70, 1973.
- 83 SCHWARTZ, J.B.; FLAMHOLZ, J.R.; PRESS, R.H. Computer optimization of pharmaceutical formulations II: Application in troubleshooting. Journal of Pharmaceutical Sciences, 62(9):1518-9, 1973a.
- 84 SHAW, D.J. Introdução à química dos colóides e de superfícies. São Paulo, Blücher, 1975. p.1-11.
- 85 SHAW, D.J. Introdução à química dos colóides e de superfícies. São Paulo, Blücher, 1975a. p.42-112.
- 86 SILVA, J.B. & GROTTA, A.S. Anatomia da folha e óleo essencial de *Baccharis retusa* DC., Compositae. Revista de Farmácia-Bioquímica da Universidade de São Paulo, 9(2):321-6, 1971.
- 87 SIMÕES, C.M.O. Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1984. 186f. Dissertação de Mestrado em Farmácia.

- 88 SIMÕES, C.M.; BAUER, L.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Analisis de flavonoides de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. SAFYBI, 28(77):2626-30, 1988.
- 89 SOICKE, H. & LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Medica, 53(1):37-9, 1987.
- 90 SONAGLIO, D. Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Compositae (Marcela). Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1987. 163f. Dissertação de Mestrado em Farmácia.
- 91 SPAICH, W. & GRACZA, L. Standardisierte Phytopharmaka-eine Voraussetzung für erfolgreiche Phytotherapie. Pharmazeutische Zeitung, 125(36):1706-7, 1980.
- 92 SRIVASTAVA, V.K. & KISHORE, K. Introduction to chromatography- teory and practice. New Dehli, S.Chand, 1985. p.21-2.
- 93 SRIVASTAVA, V.K. & KISHORE, K. Introduction to chromatography- teory and practice. New Dehli, S.Chand, 1985a. p.58-63.
- 94 STAHL, E. ed. Thin-layer chromatography. 2.ed. Heidelberg, Springer, 1969. p.875.
- 95 STAHL, E.; DUMONT, E.; JORK, H.; KRAUS, Lj.; ROZUMEK, K-E.; SCHORN, P-J. Analyse chromatographique et microscopique des drogues. Stuttgart, Entreprise, 1970. p.231.
- 96 STEINEGGER, E. & HÄNSEL, R. Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie. 4.ed. Berlin, Springer, 1988.
- 97 STEWART, A.G.; GRANT, D.J.W.; NEWTON, J.M. The release of a model low-dose drug (riboflavine) from hard gelatin capsule formulations. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 31:1-6, 1979.

- 98 STRACK, D. & KRAUSE, J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring mixtures of flavone derivatives. Journal of Chromatography, 156:359-61, 1978.
- 99 SUCKER, H.; FUCHS, P.; SPEISER, P. ed. Pharmazeutische Technologie. Stuttgart, Georg Thieme, 1978.
- 100 SWAIN, T. Flavonoids. In: GOODWIN, T.W. ed. Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2.ed. London, Academic, 1976. v.2, cap.20, p.177-8.
- 101 THE UNITED States Pharmacopeia. 20.ed. Easton, Mack, 1980. p.891-3.
- 102 TYMAN, J.H.P. XIII*. Quantitative analysis of the phenolic composition of natural cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) by thin layer chromatography, densitometry and ultraviolet spectrophotometry. Journal of Chromatography, 166:159-72, 1978.
- 103 VAN'OS, F.H.L. Le dosage de l'huile essentielle dans les drogues vegetables. Pharmaceutisch Weekblad, 100:377, 1965.
- 104 VICHNEWSKI, W. Estrutura e estereoquímica de lactonas isoladas de: Eremanthus goyazensis, Vanillosmopsis erythropappa e Baccharis trimera (Compositae). Ribeirão Preto, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1976. 154f. Tese de Livre Docência.
- 105 VILLAR, A.; JIMÉNEZ, A.; MÁÑEZ, S. HPLC of sideritis polymethoxyflavones. Pharmazie, 40(10):731, 1985.
- 106 VIRAG, L. Optimization of processes through planned production experiments. International Chemical Engineering, 10(4):513-20, 1970.
- 107 VLIETINCK, A.J. Biological active substances from tradicional drugs. In: HOSTETTMANN, S. & LEA, P.J.

Biologically active natural products. Oxford, Clearedon, 1987. p.33-47.

- 108 VOIGT, R. & BORNSCHEIN, M. Tratado de tecnologia farmaceutica. 3.ed. Zaragoza, Acribia, 1982. p.66-72.
- 109 VOIGT, R. & BORNSCHEIN, M. Tratado de tecnologia farmaceutica. 3.ed. Zaragoza, Acribia, 1982a. p.496-504.
- 110 VOIRIN, B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. Phytochemistry, 22(10):2107-45, 1983.
- 111 WASICKY, R.; BARBIERI, E.; WEBER, H. Contribuição para o método de dosagem de princípios ativos em drogas e preparação pelo amargor. Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo, 3:113-9, 1943.
- 112 WEIß, R.F. Lehrbuch der Phytotherapie. 6.ed. Stuttgart, Hippokrates, 1985.
- 113 WOJAHN, H. Galenische Pharmazie. 2.ed. Dresden-Leipzig, T. Steinkopff, 1951. p.171-2.
- 114 WOJAHN, H. Galenische Pharmazie. 2.ed. Dresden-Leipzig, T. Steinkopff, 1951a. p.184-6.
- 115 WULP, W. & NAGEL, C.W. Analysis of phenolic acids flavonoids by high-pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography, 116:271-9, 1976.
- 116 YATES, F. & HALE, R.W. The analysis of latin squares when two or more rows, columns or treatments are missing. Journal of the Royal Statistical Society, 6(supl.):67-79, 1939.

- 117 ZEPERNICK, B.; LANGHAMMER, L.; LÜDCKE, J.B.P. Lexikon der offizinellen Arzneipflanzen. Berlin, de Gruyter, 1983.
- 118 ZHI-CEN, L. General control methods for vegetable drugs. Geneva, WHO, 1980. p.31-3.